

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie



N° d'ordre : 134/DS/2019
N° de série : 04/MB/2019

THÈSE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences
Option : Microbiologie

THÈME

Mise au point d'une méthode d'évaluation du risque bactérien
par une approche *a priori* : Cas de la chaîne de fabrication du lait
pasteurisé

Présentée par : BOULTIFAT Linda

Devant le Jury

Président :	Pr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Directeur de thèse :	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafid	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. RIBA Amar	Univ. M'Hamed Bougara Boumerdès
	Pr. ARHAB Rabah	Univ. Larbi Ben M'hidi O.E.B
	Pr. BENHIZIA Yacine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire : 2018/2019

Remerciements

Que Monsieur HAMIDECHI M. Abdelhafid (Professeur au département de Microbiologie Appliquée de l'Université des Frères Mentouri Constantine 1) trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour avoir accepté la responsabilité de ce travail et de l'avoir suivi de très près avec une grande attention et une disponibilité remarquable.

Je remercie Mr BOUDEMAGH Allaoueddine (Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine1) de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur RIBA Amar (Professeur à l'Université M'HAMED bougara Boumerdes), Monssieur ARHAB Rabah (Professeur à l'Université LARBI BENMHIDI O.E.B) et Monssieur BENHIZIA Yacine (Professeur à l'Université des Frères Mentouri Constantine1) d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Remerciements

Je suis très reconnaissante au Directeur Général de la laiterie « Palma Nova » Mr ALLALI Hanafi pour m'avoir accueillie au sein de son unité, ainsi qu'à toute l'équipe de son laboratoire de Microbiologie, à leur tête Mr GUEHAM Rabia.

Je tiens également à remercier les Professeurs Didier RAOULT et Jean Marc ROLAIN pour m'avoir accueillie au sein de leur Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes, URMITE. Faculté de Médecine (Marseille).

Merci à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Dédicaces

A mes très chers parents

En hommage à tous les sacrifices que vous avez consenti pour moi. Je vous remercie d'avoir fait de moi ce que je suis. Aucune dédicace, aucun mot, ne saurait exprimer réellement mon profond amour, mon respect et ma vive gratitude. Veuillez trouver dans ce travail le fruit de toutes vos espérances et vos sacrifices.

A mon très cher époux qui m'a encouragé, qui m'a donné la force et la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés. Merci pour m'avoir soutenu dans les moments les plus difficiles.

A ma très chères filles, Anaïs Ismahane & Sara Oumeïma

A mes chers frères et sœur

A ma belle famille, je dédie ce mémoire

Quoique je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Si j'en suis là, c'est bien grâce à vous.

Que Dieu vous donne longue vie et vous protège pour moi.

Linda.

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations et acronymes.....	i
Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Introduction.....	1

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. TECHNOLOGIE DU LAIT PASTEURISÉ.....	4
1.1. Définition du lait.....	4
1.2. Procédé de fabrication du lait pasteurisé.....	4
1.2.1. Lait cru pasteurisé.....	6
1.2.2. Lait reconstitué et/ ou recombinaé pasteurisé.....	6
1.3. Qualité du lait reconstitué et /ou recombinaé.....	8
1.3.1. Qualité de l'eau.....	8
1.3.2. Qualité de la poudre de lait.....	9
1.4. Sources de contamination du lait.....	11
2. HYGIÈNE, SÉCURITÉ ET SALUBRITÉ POUR UN LAIT DE QUALITÉ.....	11
2.1. Hygiène et salubrité dans les usines laitières.....	12
2.2. Outil de garantie de la qualité : la méthode HACCP.....	13
2.3. Présentation de l'HACCP.....	14
2.3.1. Définition.....	14
2.3.2. Principes du système HACCP.....	15
2.3.3. Les étapes de la mise en place de la démarche HACCP.....	17
3. MÉTHODES MOLÉCULAIRES UTILISÉES DANS L'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES.....	28
3.1. Identification génotypique.....	29
3.1.1. Identification par séquençage du gène <i>ADNr 16S</i>	29

3.1.2. Identification par séquençage des gènes de ménage.....	30
3.2. Identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	31
3.2.1. Historique.....	32
3.2.2. Principe général d'un spectromètre de masse.....	33
3.2.3. Principe de la technique MALDI.....	34
3.2.4. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF.....	35
3.3. Les prédictions des structures 2D des ADNr.....	37
3.4. Algorithmes de prédiction de structure secondaire de base.....	40

PARTIE EXPÉRIMENTALE

MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	43
1. Prélèvement des échantillons de lait	43
2. Traitement des échantillons.....	46
2.1. Préparation des solutions mères.....	46
2.2. Préparation des dilutions.....	46
3. Analyses microbiologiques des échantillons.....	46
4. Identification des isolats bactériens.....	48
4.1. Identification phénotypique.....	48
4.2. Identification protéomique par MALDI-TOF.....	48
4.3. Identification génotypique	49
4.3.1. Amplification par PCR standard du gène de l'ADNr 16S.....	49
4.3.2. Séquençage du gène <i>ADNr16S</i>	52
5. Alignement multiple et Analyse phylogénétique.....	52
6. Analyse bioinformatique des gènes <i>ADNr 16S</i>	52

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. RÉSULTATS.....	53
1.1. Analyses microbiologiques.....	53
1.1.1. Evaluation de la qualité hygiénique des échantillons de lait.....	53
1.1.2. Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats bactériens.....	56
1.2. Identification protéomique par MALDI-TOF MS.....	59
1.3. Identification génotypique (Séquençage du gène de l'ADNr 16S).....	62
1.4. Prédiction de la structure 2D du gène de l'ADNr 16S.....	64
2. DISCUSSION.....	67
2.1. Analyse microbiologique.....	67
2.1.1. Matières premières (Poudre de lait et eau de reconstitution).....	67
2.1.2. Lait reconstitué avant / après pasteurisation et produit fini.....	68
2.2. Identification des isolats bactériens.....	69
2.2.1. Analyse phénotypique et biochimique des isolats.....	72
2.2.2. Analyse protéomique.....	73
2.2.3. Analyse du gène <i>ADNr</i> 16S.....	74
2.2.4. Prédiction de la structure 2D du gène de l'ADNr16S.....	76
Conclusion et perspectives.....	79
Références bibliographiques.....	81
Annexes	
Résumés	

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET ACRONYMES

AFNOR : Association Française de Normalisation

AMDEC : Analyse des Modes de Défaillance et Étude de la Criticité

AI: Auto-Inducteur

AW: Activité de l'eau

BCP: polychlorures de biphényles

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BLASTn: BLAST Nucleotide

BP: Baird Parker

BPH : Bonnes Pratiques d'Hygiène

CCP: *Critical Control Point*

COSBA : *Columbia Sheep Blood Agar*

DCL: Desoxycholate-Citrate Lactose

DHB: Acide 2,5 dihydroxybenzoïque

DLUO : Date Limite d'Utilisation Optimale

dNTP : désoxyribonucléotides-triphosphate

EPT : Eau Péptonnée Tamponnée

FAO: *Food and Agriculture Organization*

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate Déshydrogénase

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

HAZOP : HAZard and Operability Point

HSE : Hygiène, Sécurité & Environnement

IANOR : Institut Algérien de Normalisation

ISO: l'Organisation Internationale de Standardisation

JORADP : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire.

LCR: liquide céphalorachidien

MALDI-TOF MS: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry.*

MGLA: Matière Grasse Liquide

MLST: *MultiLocus Sequence Typing*

MSP: *Main Spectra Projection*

MSU: Matière Sèche Utile

NASA : *National Aeronautics and Space Administration*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

OMS : Organisation Mondiale de la Sante

ONS : Office National des Statistiques

pb : paire de base

PCA: *Plate Count Agar*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PRPo : PRogramme Prérequis opérationnel

SA: Acide sinapinique

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

snARN : *small nuclear RNA*

snoARN : *small nucleolar RNA*

SM : Spectrométrie de Masse

TB : Taux Butyreux

TFA : TriFluoroacetic Acid

Tm : Température de demi-dénaturation

TP : Taux Protéique

α -HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxy-cinnamique

WPNI : Whey Protein Nitrogen Indice

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé reconstitué.....	5
Figure 2: Principes du plan HACCP et bonnes pratiques d'hygiène.....	17
Figure 3 : Séquences logiques d'application du système HACCP.....	18
Figure 4 : Diagramme d'Ishikawa ou méthode des 5M.....	23
Figure 5 : Exemple d'arbre de décision permettant de déterminer les CCP.....	25
Figure 6 : Fonctionnement de la technique MALDI-TOF MS.....	36
Figure 7 : Représentation schématique d'un nucléotide (à droite) et d'une chaîne d'un ARN (à gauche).....	37
Figure 8 : Succession de liaisons Watson-Crick (en bleu) et une Wobble (en vert) formant une tige, un motif fondamental de la structure 2'	38
Figure 9 : Structure schématique basique des principaux motifs rencontrés dans la structure 2D des ARNr.....	39
Figure 10: Différents types de conformation des tiges dans la structure 2' d'un ARNr (a) : Tiges emboîtées ; (b) : Tiges juxtaposées.....	39
Figure11 : Exemple d'une annotation sous format de parenthèses d'une structure 2D.....	40
Figure 12 : Diagramme de fabrication du lait reconstitué pasteurisé et sites de prélèvement des échantillons.....	44
Figure 13 : Dendrogramme des douze isolats construit avec la méthode des carrés de la distance Euclidienne.....	58
Figure 14 : Caractéristiques des profils protéiques des douze isolats révélés par MALDI-TOF MS.....	60

Figure 14 (suite) : Caractéristiques des profils protéiques des douze isolats révélés par MALDI-TOF MS.....	61
Figure 15: Dendrogramme des isolats bactériens (avec redondance) réalisé avec le logiciel MALDI BioTyper TM 3.0.....	62
Figure 16 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode du maximum de vraisemblance montrant les liens phylogénétiques entre les séquences des gènes de l'ADNr 16S de 5 isolats bactériens.....	64

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Spécification de la poudre de lait destinée à la consommation humaine.....	9
Tableau 2 : Matrices utilisées selon le type de molécules analysées.....	34
Tableau 3 : Outils et suites centrées sur l'ARN.....	42
Tableau 4 : Techniques et sites de prélèvement des échantillons.....	45
Tableau 5 : Flores bactériennes recherchées pour les différents produits retenus pour l'analyse microbiologique.....	47
Tableau 6 : Amorces utilisées pour le séquençage de l' <i>ADNr 16S</i>	51
Tableau 7 : Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur la poudre de lait destinée à la transformation.....	53
Tableau 8 : Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur l'eau de reconstitution.....	54
Tableau 9 : Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur le lait reconstitué avant pasteurisation et le lait reconstitué pasteurisé.....	55
Tableau 10 : Résultat des tests phénotypiques et biochimiques des isolats bactériens.....	56
Tableau 11 : Scores d'identification par MALDI-TOF MS des 12 isolats	59
Tableau 12: Résultats du BLAST N des séquences du gène <i>ADNr16S</i> de cinq isolats bactériens.....	63
Tableau 13 : Codes GenBanK des séquences d'ADNr 16S pour les 5 isolats bactériens.....	63
Tableau 14 : Motifs 2D Structuraux des trois isolats <i>Bacillus</i>	65
Tableau 15 : Énergies libres après folding.....	66

Introduction

Le lait et les produits laitiers occupent une place prépondérante dans la part alimentaire de la population algérienne. Ils représentent la principale source de protéines d'origine animale (Senoussi, 2008). En regard à sa composition en éléments nutritifs essentiels et en énergie métabolisable, le lait est considéré comme une matière hors du commun, devenue progressivement une plateforme pour des bénéfices santé additionnels et une source d'ingrédients à haute valeur ajoutée pour l'homme.

En Algérie, la production de lait est en plein essor. En l'an 2000, le pays a produit 1.500.000.000 L. Depuis, la production a largement évoluée, et en 2005 elle a atteint 2.000.000.000 L. Selon une enquête réalisée par des experts algériens au profit de l'APAB (Association des producteurs algériens de boissons), l'étude estime que la capacité de production des laiteries installées sur le territoire national en l'an 2015 varie entre 2,9 et 3,2 milliards de L/an. Malgré cette évolution de production, l'Algérie reste toujours dépendante du marché mondial pour s'approvisionner en poudre de lait destinée à la consommation et la transformation puisque le taux démographique a atteint une proportion considérable (40,4 millions d'habitants en 2016). L'enquête de consommation de l'Office National des Statistiques (ONS), relative à l'année 2002, situe le niveau de consommation à 82,6 L/habitant/an. Pour 2015, ce chiffre s'est situé à 87,6 L/habitant/an. Ce niveau appréciable du point de vue nutritionnel est un des plus élevés de la région du Maghreb : 86 L/habitant/an en Tunisie et 50 L/habitant/an au Maroc.

Les produits laitiers posent de sérieux problèmes à l'industrie laitière et aux autorités de santé publique (Melo, Andrew et Faleiro, 2015), car ils peuvent être des sources importantes de pathogènes d'origine alimentaire (Oliver, Jayarao et Almeida, 2005). Plusieurs auteurs ont signalé des incidents de maladies d'origine alimentaire associées aux produits laitiers (Honish *et al.*, 2005; Heuvelink *et al.*, 2009; Lindstrom *et al.*, 2010; Papademas et Bintsis, 2010; Gould, Mungai et Barton, 2014 ; Motarjemi *et al.*, 2014 ; Johler *et al.*, 2015 ; Garcell *et al.*, 2016). Dans les pays industrialisés, le lait et les produits laitiers sont impliqués dans 2,6 % des éclosions de maladies d'origine alimentaire (Claeys *et al.*, 2013).

La principale contrainte, à tous les niveaux de la filière lait en Algérie spécifiquement, est liée aux mauvaises conditions d'hygiène et au non-respect de la réglementation. Des défaillances au niveau des maillons de la filière, conditionnent la qualité sanitaire du produit final. L'insécurité sanitaire des produits laitiers est liée à certaines zoonoses bactériennes,

transmissibles à l'homme et qui affectent les femelles laitières comme la tuberculose, la brucellose, les salmonelloses, les mammites staphylococciques et la listériose. Cette dernière a été diagnostiquée en Algérie, pour la première fois en 1967, lors d'une méningite d'étiologie inconnue. Les toxi-infections alimentaires à *Staphylococcus aureus* sont diagnostiquées en Algérie lors de mammites ou de contamination du lait par les "mains sales". Les salmonelloses, à partir des fromages à base de lait cru ou de lait contaminé après pasteurisation, sont également présentes. En 2005, les produits laitiers étaient responsables de 18,8 % des toxi-infections alimentaires collectives (Plan national de salubrité des aliments, 2006. FAO/OMS).

Pour faire face à tous les risques alimentaires suscités, une nécessité accrue à introduire des systèmes de gestion des risques et d'autocontrôles, dans les unités de transformation des produits laitiers, visant à fournir des produits surs répondant aux normes s'impose.

Les méthodes classiques de contrôle de la qualité qui ne mettent l'accent que sur la qualité hygiénique des produits finis sont inadéquates, pour contrôler les dangers qui se produisent aux premiers stades du processus de fabrication. A ce moment et dans le but de fournir des aliments sains et prévenir les éclosions de maladies d'origine alimentaire la démarche "analyse des dangers, points critiques pour leur maîtrise" (HACCP) vient utiliser en tant qu'outil de gestion de la sécurité sanitaire des aliments, une approche de maîtrise des points critiques tout au long de la chaîne alimentaire, assurant ainsi une amélioration de la sécurité des aliments (Food Product Association (FPA), 2006 ; Allata, 2017). Plusieurs rapports ont indiqué l'amélioration de la qualité microbiologique des produits alimentaires suite à l'application du système HACCP (Kassem *et al.*, 2002 ; Soriano *et al.*, 2002 ; El-Hofi, El-Tanboly, & Ismail, 2010 ; Wang *et al.*, 2010 ; Kokkinakis *et al.*, 2011; Nada, Ilija *et al.*, 2012).

Le système HACCP est reconnu dans la communauté internationale de la sécurité alimentaire en tant que ligne directrice mondiale pour contrôler les dangers d'origine alimentaire (Kafetzopoulos *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2011). Ses principes, détaillés dans les directives du *Codex Alimentarius*, sont intégrés dans la norme internationale ISO 22000 : 2005 (ISO 22000, 2005) et ont été incorporés dans la législation alimentaire Algérienne en 2010, par le biais du décret exécutif 10-90 fixant les conditions et les procédures pour les accreditations sanitaires d'institutions dont l'activité est liée aux animaux, produits animaux et produits d'origine animale et à leur transport (JORADP, 2010).

Certaines grandes unités de transformation en Algérie, ont mis en place le système ISO 9000 version 2001 mais n'ont pas encore adopté le système HACCP relatif à l'analyse des dangers et à la maîtrise des points critiques (Plan national de salubrité des aliments, 2006. FAO/OMS).

L'identification et la différenciation des bactéries liées à l'alimentation sont indispensables à l'assurance qualité et constituent la base de la sécurité alimentaire (Wenning *et al.*, 2014). Les techniques microbiologiques fondamentales appliquées à la détection des pathogènes d'origine alimentaire reposent toujours sur des approches usuelles classiques et longues. En moyenne, les procédures microbiologiques de routine du lait durent de 5 à 8 jours et nécessitent l'utilisation de divers tests biochimiques et l'évaluation d'experts (Dos Santos *et al.*, 2010) .

Dans ce contexte, l'objectif visé par cette thèse est partagé en deux actions principales :

- Adopter un système d'évaluation du risque microbiologique pour une meilleure connaissance des flux de contamination à travers la ligne de production. Ceci permettra d'identifier les étapes critiques du processus de contamination.
- Évaluer la technologie MALDI-TOF MS, largement utilisée dans le diagnostic clinique, mais moins explorée dans la détection et l'identification de pathogènes d'origine alimentaire (Jadhav *et al.*, 2014, Pavlovic *et al.*, 2013), en tant qu'outil efficace et rapide permettant l'identification des dangers bactériens associés au lait pasteurisé en tenant compte des exigences spécifiques et des protocoles d'identification microbiologique de l'industrie laitière.

Synthèse bibliographique

1. TECHNOLOGIE DU LAIT PASTEURISÉ

1.1. Définition du lait

Le lait est, d'après une définition officielle proposée au congrès international de la répression des fraudes en 1908 à Genève, le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière en bonne santé, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum.

Selon le JORADP (1993), la dénomination lait est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale obtenue par une ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction et n'ayant pas été soumis à un traitement thermique. Cette dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservé au lait de vache.

1.2. Procédé de fabrication du lait pasteurisé

La technologie du lait pasteurisé est simple (Figure 1). Sa production et sa commercialisation doivent respecter des normes précises pour éviter toute détérioration et tout risque pour le consommateur (M'boya *et al.*, 2001).

L'industrie laitière a pour origine première le lait de vache comme matière première de base. Le premier stade de transformation est le traitement thermique du lait (pasteurisation ou stérilisation), combiné à une opération d'écémage. En Algérie, le produit fabriqué en usine est en majeure partie, un lait reconstitué et/ou recombinaison. Il peut être entier (28g/L de matière grasse), partiellement écrémé (15 à 20g/L de matière grasse) ou écrémé (0g/L de matière grasse) (Kaci et Sassi., 2007).

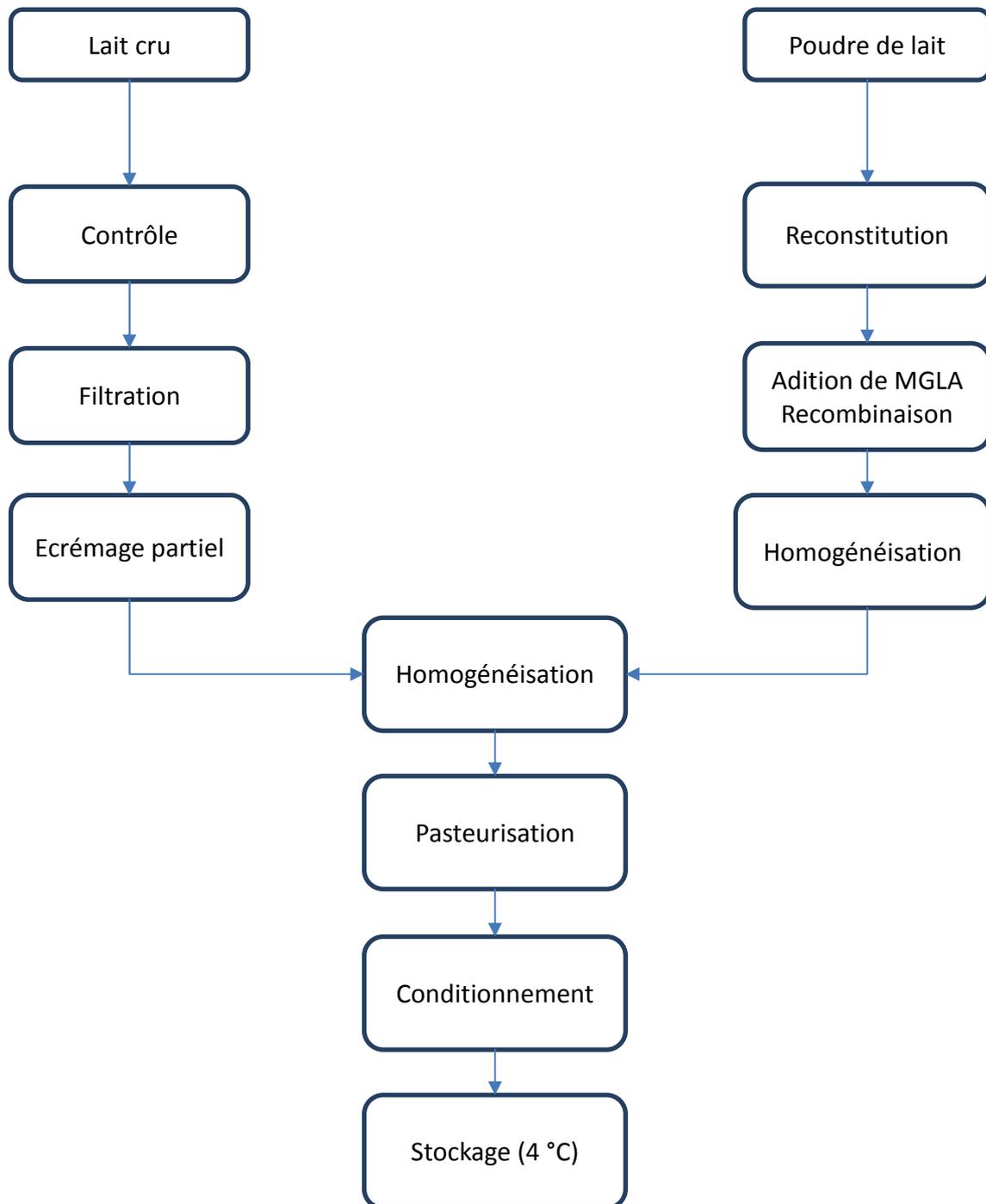


Figure 1 : Diagramme de fabrication du lait pasteurisé (M'boya *et al.*, 2001).

1.2.1. Lait cru pasteurisé

Le lait cru, collecté par la laiterie, passe par des étapes essentielles :

- L'écémage-dosage : Le lait cru est écémé afin de séparer la crème et le lait. Après écémage, le lait passe par le tank mélangeur afin de lui rajouter de la crème (matière grasse) selon le type de lait désiré. Ainsi obtient-on trois types de lait :

- le lait entier qui contient 3,5% de matière grasse ;
- le lait demi-écémé qui contient 1,5 à 1,8% de matière grasse ;
- le lait écémé, sans matière grasse (Kaci M. et Yahiaoui S., 2017).

- La pasteurisation : Le lait contient des micro-organismes susceptibles de se développer après la sortie de la mamelle. Parmi eux, certains sont utiles (ferments lactiques...), d'autres nuisibles à la santé. Au cours de la pasteurisation, le lait est chauffé à 85 °C/15-20 secondes puis refroidi très rapidement. Cependant, ce lait pasteurisé contient encore des germes et doit donc être conservé au froid (sa consommation est limitée à sept jours suivant le traitement) (Kaci M. et Yahiaoui S., 2017).

1.2.2. Lait reconstitué et/ ou recombinaison pasteurisé

Quand le lait est produit à partir de la poudre de lait et de la matière grasse laitière anhydre (MGLA), la laiterie procède d'abord par la reconstitution et /ou la recombinaison du lait pour, ensuite, lui faire subir le traitement de pasteurisation (lait reconstitué pasteurisé).

- Reconstitution et /ou recombinaison du lait.

La reconstitution et la recombinaison sont très largement pratiquées dans les pays à faible production laitière, notamment dans ceux en développement, en vue de préparer des laits de consommation, des laits fermentés, du fromage, de la crème, ou d'autres produits laitiers.

- La reconstitution, consiste à mélanger de l'eau et du lait en poudre écémé afin d'obtenir un produit dont la teneur en matière sèche est voisine de celle du lait liquide initial (ou conforme à un rapport eau/ matière sèche donné). La reconstitution peut aussi être la dilution d'une poudre de lait grasse dans de l'eau;

-La recombinaison, consiste à ajouter à l'eau et à la poudre de lait de la matière grasse laitière anhydre, de façon à obtenir un lait entier ou partiellement écrémé présentant à la fois les rapports eau/matière sèche totale et matière grasse/matière sèche dégraissée conformes au produit désiré.

- Méthodes de reconstitution et de recombinaison.

La reconstitution et la recombinaison sont relativement simples et satisfaisantes dans la mesure où l'on tient compte d'un certain nombre de précautions (FAO, 2010). La température de reconstitution varie entre 35 et 45 °C. La poudre est versée dans l'eau contenue dans une cuve ou, mieux, dans un tank et agitée assez énergiquement pendant 20 à 30 minutes. Afin de permettre une bonne hydratation de la poudre, le mélange est maintenu sous agitation à la température de 5 à 10 °C pendant 5 à 12 heures.

Au cours de l'opération, il est nécessaire d'éviter l'introduction d'air dans le mélange. Il est préférable d'utiliser les dispositifs de mélange comportant une pompe de recirculation avec apport de la poudre par une trémie située avant la pompe plutôt que ceux comportant la simple agitation mécanique en tank ou en cuve. Un système de filtration ou de nettoyage centrifuge peut être utile pour éliminer les particules résiduelles.

On procède ensuite à la pasteurisation du lait à la température de 74°C pendant 15 à 20 secondes. S'il s'agit de mélanges à teneurs en matières sèches plus élevées, la température doit être augmentée (80-85 °C pendant 20 à 25 secondes). La pasteurisation peut être suivie d'un dégazage permettant l'élimination de saveurs anormales de certaines poudres (saveur de vieux) (FAO, 2010).

Dans le cas de la préparation du lait reconstitué l'apport de matière grasse se fait:

-soit directement dans le lait reconstitué (écrémé) après fluidification de la MGLA par réchauffage vers 38-42 °C. Le mélange est ensuite agité à la température de 55 à 65 °C puis homogénéisé sous une pression d'environ 250 bars;

-soit sous forme d'une crème à 20-30 pour cent de matière grasse obtenue par mélange de lait écrémé et de MGLA chauffé à 55-65 °C et homogénéisée dans un appareil à deux étages, le premier opérant à 200 bars environ et le second à 50 bars.

Cette crème est ensuite mélangée énergiquement avec le lait reconstitué écrémé préalablement préparé.

Ces laits sont ensuite pasteurisés. Au cours de la reconstitution du lait, il est indispensable d'éviter la dissémination des poudres dans la salle de traitement et d'y maintenir d'excellentes conditions d'hygiène (FAO, 2010).

- Conditionnement du lait pasteurisé : Le conditionnement est l'une des étapes critiques dans le processus de fabrication du lait pasteurisé. En effet, les risques d'introduire des microbes dans le lait pasteurisé sont importants si on ne respecte pas les règles d'hygiène élémentaires et si le conditionnement ne s'effectue pas très rapidement. Le lait pasteurisé peut alors fermenter, prendre un mauvais goût ou coaguler ce qui constitue une perte pour l'industriel. (M'boya *et al.*, 2001).

- Stockage : A la sortie de la conditionneuse les lots de lait pasteurisés sont acheminés vers des chambres froides où la température n'excède pas 6 °C. Un stockage prolongé du lait pasteurisé à des températures réfrigérées peut favoriser la croissance des bactéries psychrotrophes, qui sont capables de causer des problèmes majeurs de qualité dans l'industrie laitière. *Pseudomonas* est identifié comme étant le principal genre de bactéries de contamination du lait pasteurisé, stockée à la température recommandée de 4 °C, à la fin de sa durée de vie (Smithwell et Kailasapathy, 1995).

1.3. Qualité du lait reconstitué et /ou recombinaé

La qualité du lait reconstitué et /ou recombinaé est fonction de celle des matières premières mises en œuvre (Mahaut *et al.*, 2000).

1.3.1. Qualité de l'eau

L'eau utilisée dans la reconstitution du lait doit être potable et notamment répondre aux standards fixés par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Sur le plan microbiologique, elle ne doit contenir aucun germe pathogène. Leur recherche nécessite des techniques spéciales, on choisit comme indicateurs de pollution des germes de contamination fécale qui sont faciles à identifier et à dénombrer les plus communs sont : bactéries coliformes, dont *E. coli*, streptocoques fécaux, *Clostridium* sulfite-réducteurs (FAO, 2010).

Si l'eau n'est pas potable de façon permanente, il est indispensable de la traiter, notamment par la pasteurisation ou la chloration. Sur le plan physicochimique, elle ne doit contenir ni pesticides, ni nitrates, avoir une dureté totale comprise entre 0 et 15 et un pH voisin de la neutralité.

1.3.2. Qualité de la poudre de lait

Les poudres de lait sont des produits obtenus par déshydratation du lait de sorte que la teneur finale en eau n'excède pas 5% en poids du produit fini (Arie F. *et al.*, 2012). Cette déshydratation permet à la poudre de se conserver à température ambiante. Cependant, elle reste sensible à la chaleur et à l'humidité. Les poudres de lait ont l'avantage de pouvoir se stocker et se transporter aisément et de s'utiliser après reconstitution pour la préparation de nombreux produits: laits liquides de consommation, laits fermentés et fromages. Elles doivent être de qualité «consommation humaine» et présenter les spécifications figurant dans le tableau 1 ci-après:

Tableau 1 : Spécification de la poudre de lait destinée à la consommation humaine (FAO, 2010).

Indice WPNI (whey protein nitrogen indice) minimum	4 mg/g
Humidité maximum	4 pour cent
Matière grasse maximum	1,25 pour cent
Acidité titrable maximum (méthode ADMI)	0,10 à 0,15 pour cent
Solubilité maximum (ADMI)	1,25 ml
Impureté (particules brûlées) (ADMI)	disque B ou mieux
Germes aérobies mésophiles à 30 °C maximum dans 1 g	10 000
Bactéries coliformes maximum dans 0,1 g	Absence
Levures et moisissures maximum dans 1 g	50
Absence d'odeur et de goût désagréables ou anormaux.	
Matières grasses. On utilise généralement de la matière grasse laitière anhydre (MGLA). Elle doit répondre à la composition ci-après:	
Matière grasse minimum	99,8 pour cent
Humidité maximum	0,1 pour cent
Acides gras libres maximum (en acide oléique)	0,3 pour cent
Cuivre maximum	0,05 ppm
Fer maximum	0,2 ppm
Indice de peroxyde maximum	0,2
Bactéries coliformes dans 1 g	Absence
Odeur et goût (à 20-25 °C)	doux et francs, sans anomalies.

La qualité du produit (lait cru) avant séchage et le procédé utilisé font partie des facteurs ayant un impact sur les propriétés de la poudre finale. Les propriétés dites « générales » des poudres de lait dépendent notamment de la qualité du produit initial (lait cru) et des technologies utilisées pour leur fabrication.

- Qualité nutritionnelle : Elle dépend principalement de l'intensité des différents traitements thermiques au cours du procédé technologique. Ces traitements induisent des changements physico-chimiques qui diminuent la disponibilité des nutriments (destruction de vitamines, diminution de la teneur en lysine disponible, dénaturation des composés d'intérêt nutritionnel tels que le lactulose) (Mahaut *et al.*, 2000).

- Qualité microbiologique : Les propriétés microbiologiques des poudres dépendent essentiellement de la qualité initiale du produit et de la nature des opérations technologiques. Les différents traitements technologiques (traitement thermique, microfiltration) subits par le produit (lait cru) avant séchage conditionnent la qualité microbiologique de la poudre. Au cours du séchage, une partie de la flore initialement présente dans le produit est détruite, mais à un degré moindre que les traitements technologiques amonts subits par ses poudres (Mahaut *et al.*, 2000), de plus une autre partie n'est qu'inactivée par le stress thermique (Jeant *et al.*, 2008).

L'importance de la destruction bactérienne au cours du procédé de séchage des poudres dépend du genre de microorganisme présent et de la température de séchage qui est indiquée par la température de l'air à la sortie du distributeur d'air chaud. Une étude réalisée par Thomson, (1978) a permis de déterminer l'impact de différentes températures (93.3° C ; 82.2° C) de l'air à la sortie du distributeur d'air chaud (séchage par atomisation) sur la survie de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* et *E. coli*. Le pourcentage des survivants augmente lorsque la température décroît. En ce qui concerne le pourcentage des survivants de *Bacillus subtilis*, *Micrococcus flavus* à 93.3° et 82.2°C représentent respectivement environ 12% et 14%. Par contre, pour *E. coli* le pourcentage des survivants est beaucoup plus faible et varie de 0.02% à 0.46%. Ces taux de survivants durant le séchage montrent que le procédé de séchage ne peut pas se substituer à la pasteurisation ou à une bonne hygiène de traitement. Cette étude démontre également que les installations doivent être soigneusement protégées de toute contamination entre la pasteurisation et le séchage.

Pour les poudres dites Hatmaker (séchage Hatmaker), le préchauffage ou la pasteurisation ainsi que le séchage sur les cylindres rotatifs chauffés intérieurement par la vapeur à 150°C, détruisent tous les germes exceptés les spores, pourvu que le taux de germes thermorésistants ne soit pas élevé pour permettre leur suivie (Makambala, 2012) .

1.4. Sources de contamination du lait

Le lait contient une flore microbienne naturelle et/ou additionnelle à l'origine de la diversité de ce produit mis sur le marché. L'origine des contaminations par les bactéries pathogènes varie en fonction de la nature du produit et de son mode de production et de transformation. La contamination du lait par les germes pathogènes peut être d'origine endogène, suite à une excrétion mammaire de l'animal malade ; elle peut aussi être d'origine exogène, il s'agit alors d'un contact direct avec des troupeaux infectés ou d'un apport de l'environnement (eaux, personnel). L'ensemble des procédés de traitement et de transformation du lait peut freiner la multiplication des germes éventuellement présents ou au contraire favoriser leur développement. Les germes les plus souvent évoqués sont les mycobactéries, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, les entérobactéries, parmi lesquelles *Escherichia coli* productrice de toxines et *Salmonella*. Actuellement, la maîtrise de ces bactéries pathogènes dans le lait nécessite la mise en place de systèmes de contrôle et de surveillance. De plus en plus, la présence de bactéries pathogènes dans le lait devra être examinée dans une perspective d'analyse du risque encouru par le consommateur vis-à-vis de ces micro-organismes (Brisabois A. *et al.*, 1998).

2. HYGIÈNE, SÉCURITÉ ET SALUBRITÉ POUR UN LAIT DE QUALITÉ

Selon le *Codex Alimentarius* :

- L'hygiène alimentaire, correspond à l'ensemble des conditions et mesures nécessaires pour assurer la sécurité et la salubrité des aliments à toutes les étapes, de la production à la consommation
- La sécurité alimentaire est l'assurance (garantie) qu'une denrée comestible ne causera pas de dommage au consommateur.
- La salubrité correspond à la garantie que les aliments sont propres à la consommation humaine selon l'utilisation prévue.
- La qualité d'un produit selon l'Association Française de Normalisation (AFNOR) est un ensemble de propriétés et caractéristiques lui conférant une aptitude à satisfaire les besoins implicites ou exprimés de ses utilisateurs.

A l'instar de ces définitions, le lait doit être apte au conditionnement en lait de consommation ou à la transformation en divers produits laitiers, sans toutefois présenter de quelconques entraves technologiques. Il doit de plus, concourir à la couverture des besoins nutritionnels des consommateurs sans occasionner de désordres de leur état de santé, quelle qu'en soit la gravité.

Selon l'AFNOR la qualité du lait fait objet de quatre composantes (Cornevaux I., 2013) :

- i- La qualité technologique : Elle est fonction de la composition chimique du lait et plus particulièrement des teneurs en protéines (Taux Protéique : TP) et en matières grasses (Taux Butyreux : TB). L'ensemble TP et TB correspond à la matière sèche utile (MSU) du lait et conditionne son aptitude à la transformation.
- ii- La qualité sanitaire : Elle est fonction des critères microbiologiques de référence définis dans la réglementation. Le lait doit être issu de vaches saines, indemnes de dangers sanitaires de première catégorie ou de maladies zoonotiques, sans trace de résidus d'antibiotiques, d'antiseptiques, de pesticides, de germes pathogènes ni de témoins de défaut d'hygiène.
- iii- La qualité organoleptique : Le lait doit présenter une saveur agréable, exempt de goût de rancissement ou autre goûts désagréable.
- iv- La qualité nutritionnelle : Le lait est un aliment riche en calcium, en phosphore, en lactose, en matières grasses et en protéines.

2.1. Hygiène et salubrité dans les usines laitières

Dans le *Codex Alimentarius*, est défini un document pour suivre une chaîne alimentaire depuis la production primaire jusqu'au consommateur final. Ce document définit les conditions d'hygiène nécessaires à la production d'aliments sûrs à la consommation (Olivier, 2008).

Les bonnes pratiques d'hygiène sont précisément les règles générales d'hygiène à instaurer avant même de commencer la production. Ces règles concernent en effet tous les aspects non spécifiques à un poste de travail, mais communs à toutes les activités : il est par exemple fondamental que tous les opérateurs respectent une bonne hygiène corporelle et vestimentaire, ou encore que tous les équipements utilisés soient hygiéniquement propres.

Le maintien d'un bon niveau d'hygiène de base dans l'entreprise permet de réduire les risques de contamination. En pratique, cette hygiène de base s'instaure par la mise en place de différents programmes pré-requis : le programme de nettoyage et désinfection, le programme de lutte contre les nuisibles, le programme de formation du personnel... Le terme "pré-requis" indique bien que la bonne mise en œuvre de ces programmes est non seulement essentielle mais aussi préalable à tout autre aspect de gestion de la qualité et de la sécurité des denrées alimentaires.

2.2. Outil de garantie de la qualité : la méthode HACCP

Selon l'OMS, deux cent maladies allant de la diarrhée aux cancers, sont causées par les aliments insalubres (OMS, 2015). Ces aliments sont les causes de deux millions de décès par an (OMS, 2015). Les problèmes d'intoxications alimentaires (vache folle, poulet aux hormones, listéria, etc.) ont rendu la sécurité sanitaire des aliments l'une des préoccupations majeures chez les consommateurs (Cahuzac *et al.*, 2007). Ainsi, l'hygiène des aliments destinés à la consommation humaine, est une préoccupation qui concerne à la fois le secteur public et privé. Il est de ce fait, nécessaire de mettre en place un système efficace pouvant garantir des aliments sains aux populations.

Le système HACCP (analyse des dangers et maîtrise des points critiques) constitue un moyen pour garantir la satisfaction du consommateur et pour lutter contre les intoxications alimentaires. En effet, c'est un système de gestion de la sécurité alimentaire qui est reconnu par la communauté internationale comme une ligne directrice pour la maîtrise des risques d'intoxications d'origine alimentaire (Youssef M.K., 2013).

Les principes de l'HACCP sont intégrés dans la législation nationale en matière de sécurité alimentaire de nombreux pays et sont recommandés pour le commerce des produits alimentaires par l'OMS et la FAO (Jouve, 1995).

2.3. Présentation de l'HACCP

2.3.1. Définition : HACCP est l'abréviation de Hazard Analysis Critical Control Point (Système d'analyse des dangers et de points critiques pour leur maîtrise). La méthode est reconnue comme synonyme de sécurité alimentaire car initialement développée comme un système de sécurité microbiologique au début du programme spatial américain dans les années 1960. La NF V01-002 de 2008, définit l'HACCP en tant que démarche qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments. Cette démarche est axée sur la prévention au lieu de procéder à un contrôle *a posteriori* du produit fini : les dangers pour la sécurité des aliments sont soit éliminés, soit réduits au minimum par une prévention au stade de la production plutôt que par l'inspection des produits finis. En d'autres termes, le HACCP prévient le danger le plus tôt possible dans la chaîne alimentaire. Cette définition sous-entend trois autres définitions extraites du *Codex Alimentarius*, à savoir :

-Le danger : Il se définit comme tout agent physique, chimique ou biologique présent dans un aliment ou état de cet aliment pouvant entraîner un effet néfaste sur la santé. Les dangers peuvent être des agents :

- Physiques : corps étrangers divers (verre, os, insecte, corps métallique, ...).
- Chimiques : toxiques naturels (histamine, mycotoxines), néoformés (nitrosamine) ou acquis, résidus (antibiotiques, métaux lourds, pesticides, anabolisants, ...), contaminants (fluide réfrigérant, lubrifiant, résidus de produits de nettoyage, ...).
- Biologiques (bactérie, virus, moisissure, parasite, toxine, ...).

-Le risque: Il correspond au produit de la probabilité (vraisemblance) d'apparition de la manifestation du danger et de sa gravité. Son estimation est basée sur l'identification des dangers, l'appréciation de leurs effets et l'appréciation de l'exposition à ces dangers. L'équation d'estimation d'un risque est donnée par : $\text{Risque} = (\text{Probabilité}) \times (\text{Gravité})$. La probabilité permet de caractériser la facilité avec laquelle se produit l'enchaînement d'événements qui conduit au danger (fréquence de survenue) ; alors que la gravité (sévérité) mesure les effets sur les consommateurs (conséquences plus ou moins importantes).

-Le point critique : Il désigne une matière première, un lieu, une procédure, une étape opérationnelle où il est possible et essentiel de mettre en place une intervention de maîtrise spécifique pour garantir la sécurité des produits fabriqués. C'est un point crucial qu'il est nécessaire de maîtriser pour éviter d'avoir des effets néfastes par la suite (Boutou, 2008).

2.3.2. Principes du système HACCP

Le système HACCP comprend les sept principes généraux suivants (Figure2) :

Principe 1. Procéder à une analyse des dangers

Il s'agit d'identifier tous les dangers associés à une production alimentaire, à tous les stades du processus, de la matière première jusqu'à la consommation finale (Bariller, 1997). Il faut évaluer la probabilité de chaque danger à se concrétiser et la gravité de ses effets.

Principe 2. Identifier les points déterminants (CCP/PRPo)

Cela consiste à identifier les points critiques aux niveaux desquels un contrôle est indispensable pour prévenir ou éliminer un danger ou pour le ramener à un niveau acceptable. Les points déterminants peuvent être des CCP (Critical Control Point) ou des PRPo (Programme prérequis opérationnel). Les définitions de ces deux types de points déterminants selon la norme ISO 22000 sont les suivantes :

- Point critique pour la maîtrise (CCP) : étape à laquelle une mesure de maîtrise peut être appliquée et est essentielle pour prévenir ou éliminer un danger lié à la sécurité des denrées alimentaires ou le ramener à un niveau acceptable ;
- Programme prérequis opérationnel (PRPo) : PRP ou bonnes pratiques d'hygiène (BPH) identifié par l'analyse des dangers comme essentiel pour maîtriser la probabilité d'introduction de dangers liés à la sécurité des aliments et/ou de la contamination ou prolifération dans le(s) produit(s) ou dans l'environnement de transformation.

La différence fondamentale entre les deux notions est que le PRPo prend naissance d'un PRP alors que le CCP est une étape (*a priori* du procédé de fabrication). Mise à part cette différence de nature, leurs composantes sont quasiment identiques en tous points : ce sont des mesures de maîtrise (ISO 22000 - 3.7) essentielles vis-à-vis de dangers identifiés.

Principe 3 : Etablir les limites critiques aux CCP (seuils critiques)

Cette étape permet d'établir, aux points critiques, les limites critiques qui différencient l'acceptabilité de la non-acceptabilité c'est-à-dire le produit conforme du produit non conforme pour la prévention, l'élimination ou la réduction des dangers identifiés, ainsi que les niveaux des seuils de maîtrise pour les PRPo. Ces seuils constituent la limite absolue des CCP.

Principe 4 : Etablir un système de surveillance des CCP

Le système de surveillance doit être efficace permettant de s'assurer de la maîtrise effective des CCP par le biais d'observations et d'essais planifiés (Boutou, 2008). Idéalement, les méthodes de surveillance doivent se faire en continu. Elles doivent être capables de détecter toute défaillance au niveau d'un CCP. Ces renseignements doivent être communiqués pour prendre des mesures correctives avant qu'il devienne nécessaire de rejeter le produit. Il s'agit donc de surveiller par des séries programmées d'observations ou de mesure des paramètres (autocontrôles) que les limites critiques ne sont pas dépassées. Ces autocontrôles doivent être définis et mis en place et leurs conditions de réalisation doivent être déterminées et documentées.

Principe 5 : Etablir les actions correctives

Il s'agit de déterminer les mesures à mettre en œuvre lorsque les résultats de la surveillance appliqués au niveau des CCP révèlent la perte de la maîtrise. A ce niveau il est nécessaire de faire la distinction entre une action corrective et correction, dont les définitions établies par l'AFNOR (2007) sont les suivantes:

- Action corrective : action visant à éliminer la cause d'une non-conformité détectée ou d'une autre situation indésirable ;
- Correction : action visant à éliminer une non-conformité détectée. Ainsi, le principe d'une correction est d'agir sur le produit non-conforme alors qu'une action corrective concerne la cause de la non-conformité. Toutes les actions correctives et corrections doivent être enregistrées (Chamoret C., 2013).

Principe 6 : Vérifier le système HACCP

Ce principe consiste à définir les activités, méthodes, tests à mettre en œuvre pour vérifier si le système HACCP est bien appliqué et s'il fonctionne efficacement. Il est donc possible d'avoir notamment recours à des examens microbiologiques. Cette étape est effectuée à une fréquence régulière et adaptée aux conditions de fabrication. Les résultats découlant de cette étape permettent d'identifier et d'élaborer les améliorations du système afin que celui-ci soit toujours plus performant. Un rapport est rédigé après chaque vérification.

Principe 7 : Etablir un système documentaire

Un système documentaire (dossier) pratique et précis est essentiel pour l'application du système HACCP (Jouve, 1996 a). Il est donc recommandé d'archiver tous les documents de mise en place ainsi que chaque enregistrement de surveillance, des actions correctives et corrections.

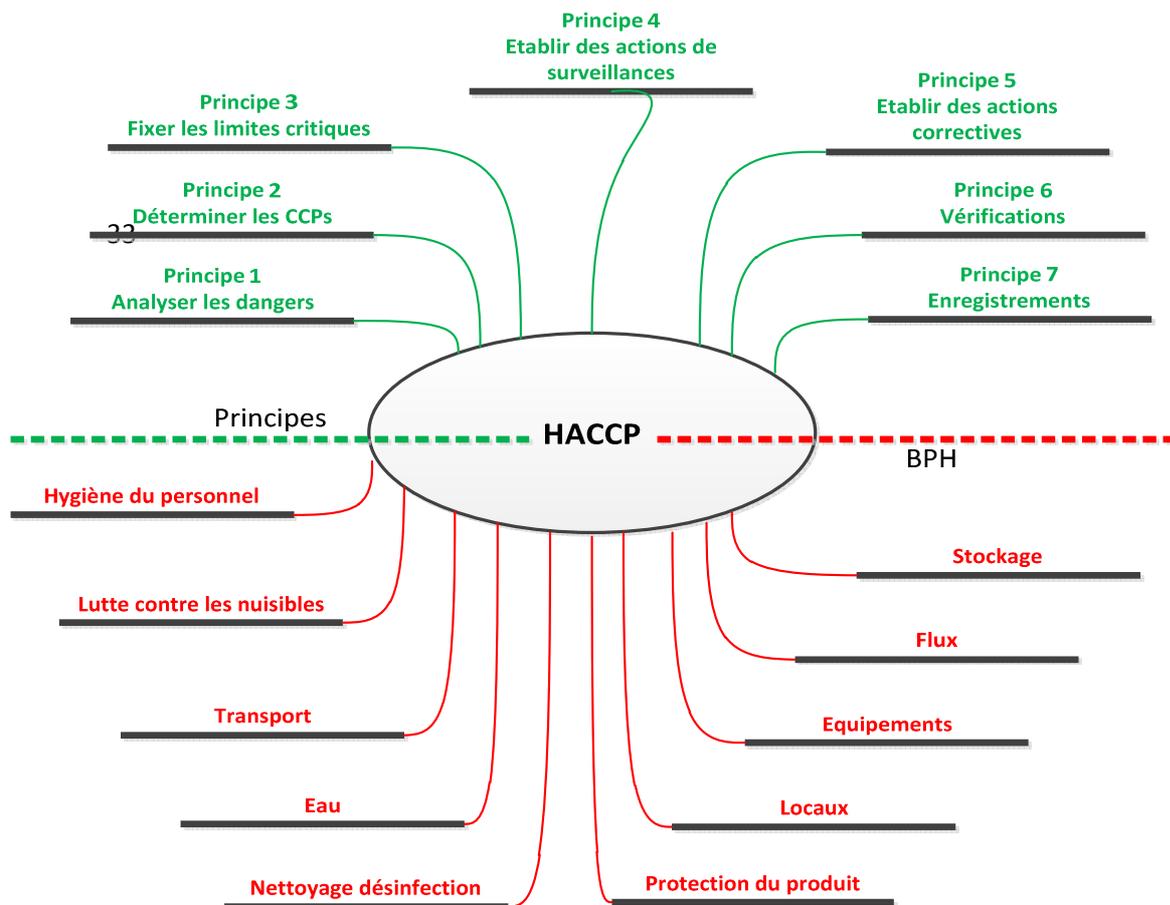


Figure 2: Principes du plan HACCP et bonnes pratiques d'hygiène (Vignola C, 2002).

2.3.3. Les étapes de la mise en place de la démarche HACCP

Selon l'indication du *Codex Alimentarius*, l'application des sept principes de la méthode HACCP passe par la réalisation d'une série d'activités se succédant dans un ordre logique et correspondant à un véritable "plan de travail" comprenant 12 étapes (Figure 3) devant être intégralement détaillées dans le manuel HACCP qui constitue la preuve et le support de la mise en place de la démarche. Il devra à tout moment être remis à jour et pourra être consulté par les services de contrôles et les clients.

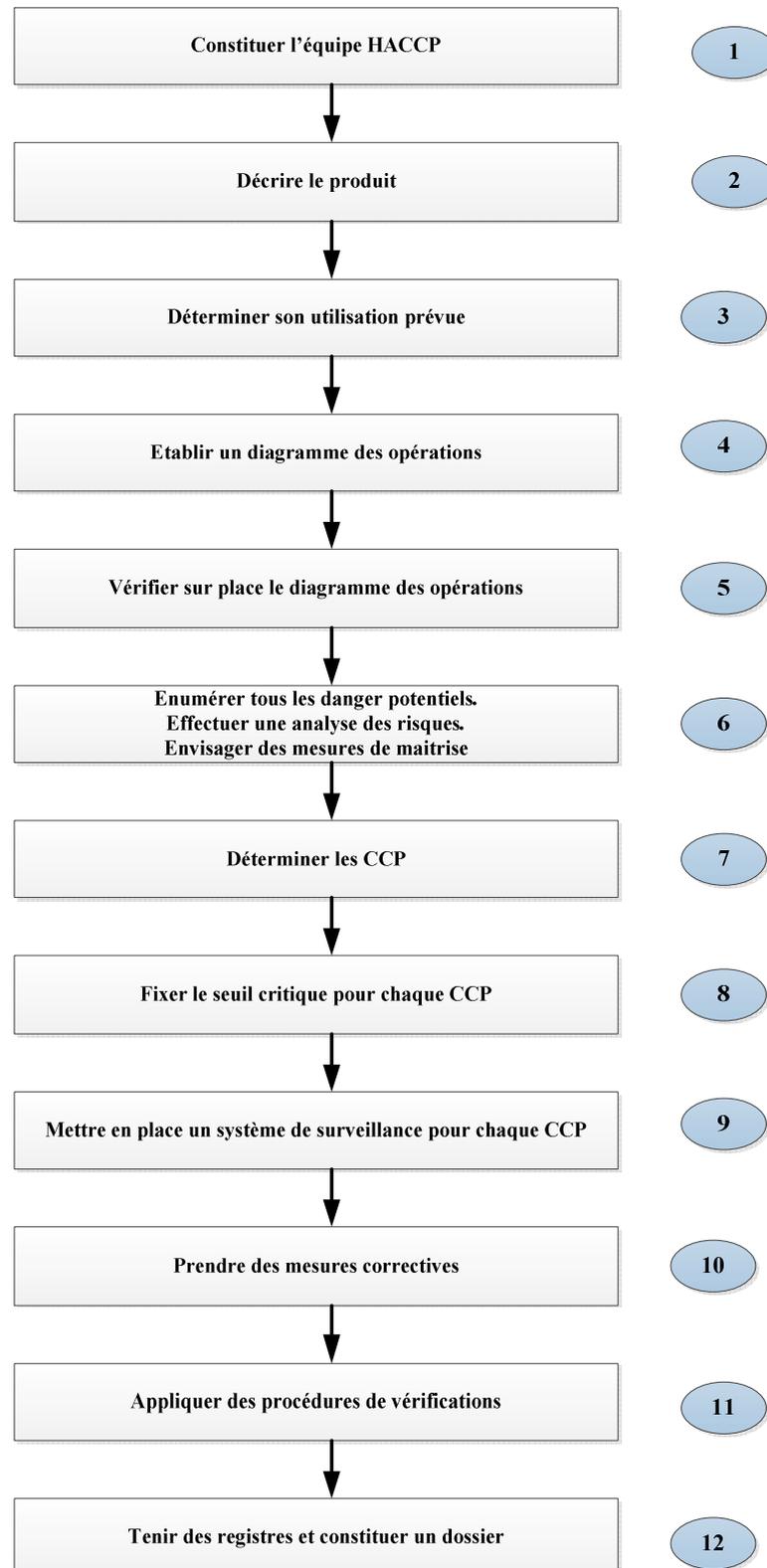


Figure 3 : Séquence logique d'application du système HACCP (*Codex alimentarius*, 2009).

Etape 1 : Constitution de l'équipe HACCP

L'objectif de cette première étape est de former une équipe pluridisciplinaire (regroupant des personnes aux compétences variées), collective et non hiérarchique. Elle comprend généralement un représentant de la direction, un expert en microbiologie, un responsable de la production, un responsable de l'entretien du matériel et de la désinfection et un responsable qualité. Les membres de l'équipe doivent connaître les principes du système HACCP, savoir construire un diagramme de fabrication, comprendre les types de dangers qui peuvent apparaître et les méthodes de prévention possible, connaître les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, savoir identifier les CCP, auditer, former et informer, connaître les bases en statistiques et les techniques de résolution de problèmes. Une fois l'équipe réunie, le champ d'application du plan HACCP doit être défini. Il est déterminé en se rapportant aux dangers connus en matière de sécurité alimentaire et du type de produit fabriqué (Bariller, 1997).

Dans un besoin spécifique, l'équipe HACCP peut contenir des experts externes microbiologistes ou consultants.

Etape 2 : Description du produit fini et sa distribution

Cette étape consiste en la description précise de tous les paramètres pour l'obtention du produit : matières premières, ingrédients, matériaux en contact avec le produit, formulation et composition : volume, forme, structure, texture, caractéristiques physicochimiques (pH, Aw, conservateurs) et températures de stockage, température de cuisson et de distribution ainsi que l'emballage. (Jeantet *et al*, 2006).

-Matières premières et ingrédients : Pour les matières premières et les ingrédients, il faut préciser leur définition, le pourcentage dans le produit fini, les caractéristiques physicochimiques telles que pH, Aw, température, densité, les critères microbiologiques, les conditions de conservation et de stockage et les conditions de mise en œuvre et de prétraitement.

-Produits intermédiaires et finaux : pour les produits intermédiaires et finaux, il faut préciser les caractéristiques générales, la durée de vie, les caractéristiques physiques et chimiques (pH, Aw), les critères microbiologiques, les traitements subis, les caractéristiques du conditionnement et les conditions de stockage et de distribution (Rige *et al*, 2004).

Etape 3 : Description de l'utilisation attendue du produit fini : identification de l'usage prévu pour le produit.

L'équipe HACCP doit spécifier pour le produit en question : le consommateur ciblé et plus particulièrement la population à risque (personnes âgées, nourrissons, femmes enceintes, immunodéprimés), les modalités de transport, de distribution, de conservation, de préparation et de consommation. L'identification de l'utilisation attendue du produit consiste également en la détermination de sa durée de vie : DLC (Date Limite de Consommation), DLUO (Date Limite d'Utilisation Optimale) et les instructions destinées au consommateur telles que les modalités de conservation et les conseils d'utilisation.

Etape 4 : Etablissement du diagramme de fabrication

L'établissement du diagramme de fabrication permet une représentation visuelle et une compréhension des étapes cruciales du processus de production. A chaque étape de la chaîne de production sont décrits avec précision, l'environnement, les intrants, les flux (personnes, matières premières, déchets), les manipulations, le matériel et la méthode utilisés, mais également les circuits parallèles et de recyclage. Ce diagramme de flux aide à repérer toutes les zones de contamination croisée potentielle dans l'établissement (Corneveaux I., 2013).

Il est recommandé de présenter séparément le diagramme de fabrication (sous forme de schéma) et les informations complémentaires et de ne pas passer trop de temps à recueillir des éléments n'ayant pas de conséquences pratiques pour la suite de l'étude (Quittet *et al.*, 1999). Le diagramme doit fournir des informations relatives à la présence de dangers ou de leurs augmentations. Ses éléments basiques sont :

- la séquence des étapes du processus de fabrication
- le point d'introduction des matières premières et ingrédients
- les points de sortie ou d'élimination des produits finis et des déchets.

La description de toutes les étapes du procédé et des mesures de maîtrise doit être réalisée. Dans cette phase, le diagramme d'Ishikawa, un diagramme de causes à effet, peut être utilisé car ces 5M sont souvent corrélés aux dangers.

Etape 5 : Confirmation du diagramme de fabrication sur le site

Il s'agit d'une vérification et confirmation qui doit être réalisée sur la ligne de fabrication (sur site) afin de s'assurer de la fiabilité du diagramme élaboré. En effet, l'équipe HACCP confronte les informations dont elle dispose (diagramme du procédé et des flux) à la réalité du terrain. Cette étape se fait sur le site, pour chaque étape du diagramme et pendant les heures de fonctionnement (Quittet *et al*, 1999).

Etape 6 : Identification et analyse du ou des dangers : Cette étape clé se déroule en trois phases importantes : l'identification des dangers et des causes associées, l'évaluation du risque et l'établissement des mesures préventives (Jeantet *et al*, 2006).

- Identification des dangers : Dans un premier temps, il convient de lister tous les dangers biologiques, chimiques et physiques, susceptibles de représenter un danger potentiel à l'égard de la santé publique, pour l'utilisateur ou le consommateur final, auxquels on peut raisonnablement s'attendre vu la nature et les caractéristiques du produit fini et de son procédé de fabrication. Dans un second temps, l'équipe doit reprendre l'analyse étape par étape pour chaque danger afin d'identifier les conditions de sa présence à chaque étape. En ce qui concerne les dangers microbiologiques, les conditions à étudier sont la présence, la contamination (ou recontamination), la multiplication ou la survie. Il est nécessaire de déterminer à chaque étape les facteurs ou activités (matières premières, ingrédient, façon de faire, etc.) susceptibles de conduire à la présence, la contamination, la multiplication ou la survie de chaque danger.

La notion de danger biologique (Boutou, 2008) concerne les virus (hépatite A et E, Rotavirus), bactéries (sporulentes comme *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* et *Bacillus cereus*, ou bactéries asporulentes comme *Brucella abortis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*), levures (*Candida spp.*), moisissures (*Aspergillus spp.*) et protozoaires (*Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, *Taenia solium* *Trichinella spiralis*); faisant partie de l'environnement immédiat des produits en fabrication.

Le danger chimique fait référence à des contaminants naturels ou ayant été ajoutés, causant des intoxications alimentaires aiguës ou des maladies chroniques. Les composés chimiques naturels concernent les allergènes et les mycotoxines, alors que les contaminants chimiques industriels peuvent être des polychlorures de biphényles (BCP), produits d'agriculture (pesticides, fertilisants, antibiotiques, plomb, cadmium, mercure, etc.).

Un danger physique peut se manifester par un corps étranger dans l'aliment (verre, bois, métal, os, etc.).

- Evaluation des dangers : Il s'agit d'évaluer à la fois les dangers et leurs causes. L'évaluation des dangers consiste à apprécier qualitativement, ou de préférence quantitativement, pour chaque danger et pour chaque condition identifié (présence, contamination, multiplication ou survie pour les dangers microbiologiques) :

-la gravité : sévérité des conséquences pour le consommateur ;

-la fréquence : lorsque celle-ci a été constatée sinon la probabilité d'apparition.

Cette méthode permet d'établir des priorités d'intervention. L'analyse des causes des dangers fait également partie de l'analyse des dangers. Là aussi, une systématique appropriée doit être suivie. Pour ce faire, il est conseillé d'avoir recourt à la méthode des 5 M ou diagramme d'Ishikawa (Figure 4). D'après Kaoru Ishikawa (1962), la liste des causes d'apparition des dangers est établie selon : Le Milieu, La Main d'œuvre, La Matière, La Méthode, Le Matériel.

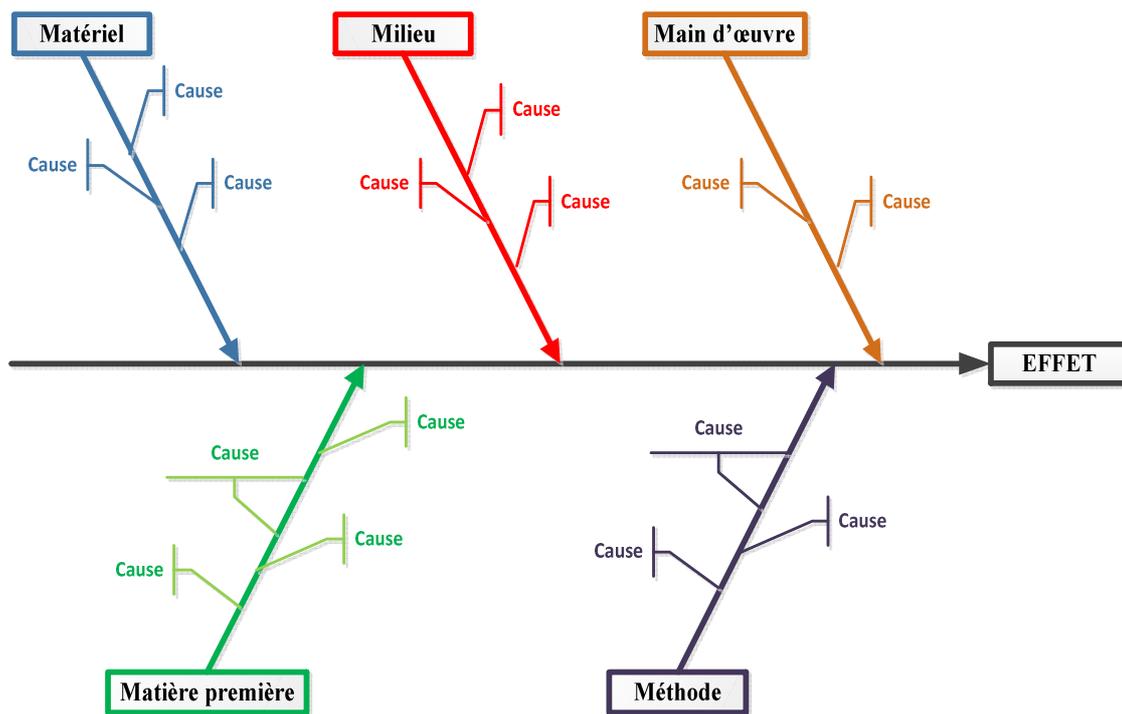


Figure 4 : Diagramme d'Ishikawa ou méthode des 5M.

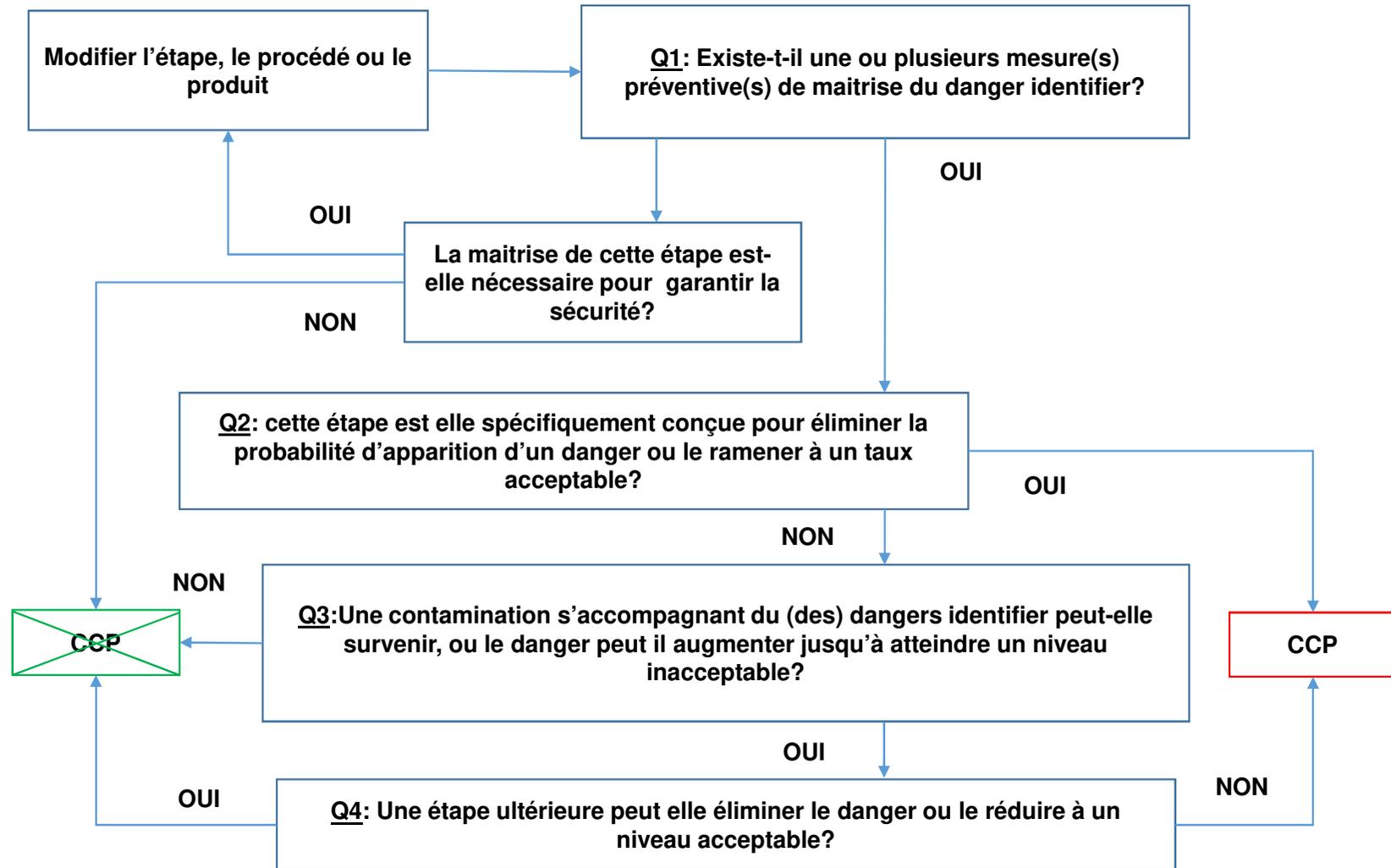
-Identification des mesures préventives

Les mesures préventives correspondent aux activités, actions, moyens ou techniques qui peuvent être utilisés pour prévenir chaque danger et/ou condition identifiés, l'éliminer ou seulement en réduire l'impact (gravité, fréquence, probabilité d'apparition) à un niveau acceptable. L'équipe HACCP doit en dresser la liste en sachant que plus d'une mesure préventive peuvent maîtriser un danger donné et que plusieurs dangers peuvent être maîtrisés par une même mesure préventive. Les mesures préventives permettant de maîtriser un danger spécifique se recoupent souvent, mais pas obligatoirement, avec les bonnes pratiques d'hygiène ou programmes prérequis (Chauvel, 1994).

Etape7 : Détermination des points critiques

L'identification des CCP se fait en se basant sur l'analyse des dangers et sur l'expérience de l'équipe. Elle peut être facilitée en utilisant l'arbre de décision proposé par le *Codex Alimentarius* (Figure 5). C'est une série de quatre questions systématiques conçues pour évaluer si un CCP est nécessaire pour maîtriser le danger identifié à une étape donnée.

- Question 1: Existe-t-il des mesures préventives pour maîtriser le danger qui mérite d'être maîtrisé? Si la réponse est OUI, indiquer cette mesure préventive et passer à la question 2. Par contre, si la réponse est NON, il faut alors indiquer comment procéder pour maîtriser le danger identifié avant ou après la fabrication ou alors modifier l'étape.
- Question 2: Cette étape est-elle spécifiquement conçue pour éliminer la probabilité d'apparition d'un danger ou le ramener à un niveau acceptable (un niveau défini dans le plan HACCP) ? Si la réponse est OUI, cette étape devient un CCP. Si la réponse est NON, passer à la question 3.
- Question 3 : Une contamination s'accompagnant du (des) danger(s) identifié(s) peut-elle survenir, ou le danger peut-il augmenter jusqu'à atteindre un niveau inacceptable ? En cas de réponse par Oui, passer à la question 4. Si la réponse est NON, ce n'est pas un CCP.
- Question 4 : Une étape ultérieure peut-elle éliminer le danger ou le réduire à un niveau acceptable ? Une réponse par OUI indique que ce n'est pas un CCP. La réponse par NON indique que cette étape est un CCP.



¹ http://quapa.com/methode_haccp.htm

Figure 5: Exemple d'arbre de décision permettant de déterminer les CCP¹.

Etape 8 : Etablissement des limites critiques pour chaque CCP

Les limites critiques correspondent aux valeurs extrêmes acceptables au regard de la sécurité du produit. Elles séparent l'acceptabilité de la non acceptabilité. Dans cette étape il faut fixer des seuils correspondant à chacun des CCP. Le choix des paramètres est basé sur des critères observables ou mesurables qui peuvent facilement démontrer la maîtrise du produit critique. Les critères peuvent être, par exemple, la température, le temps, le pH, l'Aw, la teneur en additifs, en conservateurs, en sel, les limites maximales autorisées de résidus, valeurs stérilisatrices, valeurs pasteurisatrices, critères microbiologiques, des paramètres sensoriels tel que l'aspect, la texture peuvent également être pris en compte, etc. (Jouve, 1996b). Ces limites critiques sont justifiées par des publications scientifiques, l'expérimentation ou par des experts microbiologistes et doivent être conformes aux exigences de la législation.

Etape 9 : Mise en place d'un système de surveillance pour chaque CCP

La surveillance (continue ou discontinue) est une séquence d'observations ou de mesurages afin d'évaluer si les mesures de maîtrise fonctionnent comme prévu (Boutou, 2008).

Un tel système de surveillance permet de mesurer ou d'observer les seuils critiques correspondant à un CCP. Les procédures appliquées doivent être en mesure de détecter toute perte de maîtrise. En outre, les renseignements devraient en principe être communiqués en temps utile pour procéder aux ajustements nécessaires, de façon à éviter que les seuils critiques ne soient dépassés. Dans la mesure du possible, il faudra procéder à des ajustements de procédés lorsque les résultats de surveillance indiquent une tendance en direction d'une perte de contrôle à un CCP. Ces ajustements devront être effectués avant qu'aucun écart ne survienne. Les données obtenues doivent être évaluées par une personne expressément désignée à cette fin et possédant les connaissances et l'autorité nécessaires pour mettre en oeuvre, au besoin, des mesures correctives. Si la surveillance n'est pas continue, les contrôles exercés doivent alors être suffisamment fréquents et approfondis pour garantir la maîtrise du CCP. La plupart de ces contrôles doivent être effectués rapidement, car ils portent sur la chaîne de production et l'on ne dispose pas du temps nécessaire pour procéder à des analyses de longue durée.

On préfère généralement relever les paramètres physiques et chimiques plutôt que d'effectuer des essais microbiologiques, car ils sont plus rapides et permettent souvent d'indiquer aussi l'état microbiologique du produit. Tous les relevés et comptes rendus résultant de la surveillance des CCP doivent être signés par la ou les personne(s) chargée(s) des opérations de surveillance, ainsi que par un ou plusieurs responsables de l'entreprise (*Codex Alimentarius*, 2009).

Etape 10 : Etablissement des corrections et des actions correctives

Des mesures correctives spécifiques doivent être prévues pour chaque CCP, afin de pouvoir rectifier les écarts, s'ils se produisent, c'est à dire si une limite critique est dépassée. Ces mesures doivent garantir que le CCP a été maîtrisé. Elles doivent également prévoir le sort qui sera réservé au produit en cause. Les mesures ainsi prises doivent être consignées dans les registres HACCP.

La correction est l'action qui vise à éliminer une non-conformité détectée, permettant ainsi de réduire la gravité des effets perçus. Elle concerne le devenir des produits potentiellement dangereux. Une action corrective, quant à elle, vise à éliminer la cause d'une non-conformité détectée. Elle inclut l'analyse des causes et permet d'éviter leur réapparition (Boutou, 2008, Norme ISO 9001, chapitre 8.5.2).

Etape 11 : Application des procédures de vérification

Les procédures de vérification permettent de confirmer le fonctionnement efficace des plans HACCP mis en œuvre. On peut avoir recours à des méthodes, des procédures et des tests de vérification et d'audit, notamment au prélèvement et à l'analyse d'échantillons aléatoires, pour déterminer si le système HACCP fonctionne correctement. De tels contrôles devraient être suffisamment fréquents pour confirmer le bon fonctionnement du système. Par exemple il faudrait:

- passer en revue le système HACCP et les dossiers dont il s'accompagne;
- prendre connaissance des écarts constatés et du sort réservé au produit;
- vérifier que les CCP sont bien maîtrisés.

A cette étape, un plan de contrôle microbiologique permet de vérifier la conformité bactériologique des matières premières et des produits transformés.

Etape 12 : Etablissement d'un système documentaire et archivage

Le système documentaire HACCP a pour objectif d'une part de décrire les dispositions mise en place dans le cadre de la démarche HACCP, d'autre part d'apporter la preuve que leur application est à la fois effective et efficace (Jouve, 1994). La tenue de documents précis et rigoureux est donc indispensable à l'application du système HACCP (*Codex alimentarius*, 2009). On retrouve principalement deux types de documents :

- La documentation sur le système mis en place : procédures, modes opératoires, instructions de travail se référant aux étapes 1 à 11. Ces documents constituent le « plan HACCP ». Ils sont avantageusement regroupés dans un « manuel HACCP ».
- Les enregistrements (résultats, observations, rapports, relevés de décisions, modifications apportées au système HACCP...) se référant aux étapes 1 à 11 du plan de travail (Jouve, 1994)

3. MÉTHODES MOLÉCULAIRES UTILISÉES DANS L'IDENTIFICATION DES BACTÉRIES

Les techniques de biologie moléculaire ont bouleversé l'identification des bactéries, et ont mis en lumière les insuffisances et les erreurs d'identifications phénotypiques qui étaient jusque-là seules disponibles. Le développement de ces techniques moléculaires à partir des années 1990 a permis d'introduire ces approches au sein des laboratoires d'analyses biologiques. Elles permettent d'obtenir un résultat en quelques heures voire moins dans les situations d'urgence (Identification et typage du germe, et détection des résistances antibiotiques) ou d'identifier un micro-organisme si les systèmes utilisés en routine (approche biochimique) sont pris en défaut. De plus, dans des prélèvements biologiques, elles rendent possible la caractérisation des bactéries si la culture est restée négative, si les bactéries recherchées sont des bactéries intracellulaires strictes (pour lesquelles la culture est réservée à des laboratoires spécialisés) ou des bactéries encore incultivables à ce jour.

Le gène ciblé qui est fonction des informations disponibles sur l'isolat bactérien est amplifié et comparé à des bases de données internationales (BLAST) permettant l'identification de la bactérie aux rangs du genre ou de l'espèce en fonction du pourcentage d'identité avec la souche homologue de la base de données.

3.1. Identification géotypique

3.1.1. Identification par séquençage du gène *ADNr 16S* : L'identification moléculaire des bactéries repose essentiellement sur l'analyse de la séquence de gènes qui doivent être universels, c'est à dire présents dans toutes les bactéries mais suffisamment variables pour pouvoir les différencier. La cible universelle la plus fréquemment utilisée en bactériologie pour le diagnostic de genre ou d'espèce est le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S spécifique des bactéries. Celui-ci est le constituant de la petite sous unité ribosomale du 30S. Le gène codant pour cet ARNr est l'*ADNr 16S* (Clarridge et Alerts 2004), présent dans l'ensemble des espèces bactériennes en un nombre variable de copies (Woese 1987; Reller, Weinstein, et Petti, 2007). Tous les micro-organismes possèdent en effet au moins une copie des gènes codant pour les ARN ribosomiaux. Il est composé d'environ 1500 nucléotides et est constitué de régions hautement conservées et communes à toutes les bactéries (sept régions conservées) et de neuf régions hypervariables spécifiques d'espèce (Chakravorty *et al.*, 2007).

Ce gène a d'abord été utilisé à la fin des années 1980 par Carl Woese comme outil d'étude de l'évolution bactérienne (Woese, 1987). En 1991, Weisburg *et al.* ont décrit des amorces dites "universelles" permettant d'amplifier l'intégralité du gène codant pour l'ARNr 16S de la plupart des bactéries. Actuellement de multiples amorces universelles sont décrites dans la littérature.

Il convient de séquencer au moins 500 à 525 bp, idéalement 1300 à 1500 bp. Les termes de "16S court" et "16S long" feront leur apparition dans le langage courant des microbiologistes pour faire référence à différentes longueurs de séquences amplifiées (Renvoisé, 2012). Le "16S court" fait référence à l'amplification d'une partie du gène codant pour l'ARNr 16S, le plus souvent les 500 premiers nucléotides mais ce n'est pas toujours le cas (Reller *et al.*, 2007). Pour la plupart des souches, le pouvoir discriminant de ces courtes séquences semble suffisant pour différencier les espèces entre elles (Clarridge et Alerts, 2004). Pour discriminer certains genres ou pour décrire une nouvelle espèce, l'amplification "16S long" reste une étape nécessaire (Clarridge et Alerts, 2004).

La séquence obtenue au laboratoire est comparée via le réseau Internet, à l'aide de logiciel spécialisé de GenBank maintenant appelée Nucleotide² ou de EMBL Europe³. Une bonne identification est conséquente d'un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 97 % entre la souche à identifier et celle de la base de données (Janda et Abbott, 2007). Pour Drancourt *et al.* (2000), les critères pour une identification à l'espèce sont plus de 99 % d'homologie de

séquence, idéalement > 99,5 % et une comparaison à une séquence de souche de référence identifiée par hybridation DNA-DNA.

3.1.2. Identification par séquençage des gènes de ménage (Housekeeping gene)

Les gènes de ménages sont généralement des gènes constitutifs codant des protéines nécessaires au maintien des fonctions cellulaires basales essentielles à l'existence d'une cellule, quel que soit son rôle spécifique dans l'organisme. Ils existent en un seul exemplaire chez pratiquement tous les microorganismes et présentent une grande diversité intra-spécifique (Rong et Huang, 2014). Cette caractéristique a permis de considérer ces gènes comme un outil de choix dans les expériences de typage moléculaire (Multi-Locus Sequence Typing : MLST) (Maeda *et al.*, 2000). Ils permettent d'obtenir un résultat précis et fiable dans l'identification des souches très apparentées.

Ceci présente une grande importance dans le domaine thérapeutique (identification des souches pathogène appartenant à la même espèce) (Maeda *et al.*, 2000). Les gènes de ménage sont généralement de petite taille. Celle-ci est très variable, notamment d'une espèce à une autre. Par exemple, pour le gène *pdhC* (pyruvate déshydrogénase), alors que la taille de celui-ci est de 1239 paires de base (pb) chez *Staphylococcus aureus* (Forsyth *et al.*, 2002) et de 1329 pb chez *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1997), elle n'est que de 480 pb chez *Neisseria meningitis* (Maeda *et al.*, 2000).

En pratique le choix de ces gènes est variable. Il est recommandé de choisir des gènes appartenant à des classes fonctionnelles différentes et dont l'expression est constante dans les conditions expérimentales testées. En fait, il est parfois nécessaire de tester un panel de gènes ménagers pour choisir celui qui n'est pas régulé par les conditions expérimentales.

- gène *gap*

Le gène *gap* code pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAPDH. Cette dernière la GAPDH est l'une des enzymes clé de la glycolyse. Elle catalyse la phosphorylation oxydative du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3- bisphosphoglycérate. Elle existe chez toutes les espèces étudiées et sa séquence est très bien conservée (Figge *et al.*, 1999). La participation à la glycolyse est la fonction principale de la GAPDH phosphorylante.

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>

³ <http://www.ebi.ac.uk/>

La GAPDH est un homotétramère dont les sous-unités ont une masse moléculaire variant de 34 à 38 kDa selon les espèces. Une sous-unité est composée d'environ 330 acides aminés qui se replient en formant deux domaines. Le premier domaine de chaque sous-unité fixera une molécule NAD^+ . Le second domaine de chacune des deux sous-unités sera impliqué dans la fixation du substrat et à la catalyse, essentiellement gouvernée par l'implication de deux acides aminés majeurs qui sont l'histidine et la cystéine.

- gène *rpoB*

L'identification moléculaire de certaines bactéries peut être réalisée grâce à l'analyse de la séquence d'une région spécifique du gène de la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN-dépendante (*rpoB*). L'analyse de cette séquence vient en complément de l'analyse de la séquence du gène *ARNr 16S* pour un certain nombre de groupes et de genres bactériens à l'exemple des entérobactéries (Mollet *et al.*, 1997) ou les streptocoques (Drancourt *et al.*, 2004), pour lesquelles le gène *ARNr 16S* est peu discriminant (séquences de l'ADNr 16S sont très proches) (Küpfer *et al.*, 2006; Arnold *et al.*, 2012).

- gène *gyrB*

Le gène *gyrB* code la sous unité β de l'ADN gyrase, qui est une protéine spécifique des bactéries, principalement responsable du surenroulement négatif de l'ADN, essentielle à la réplication de leur chromosome circulaire. Ce gène peut être une cible alternative efficace ou complémentaire pour l'identification et l'analyse taxonomique de certaines bactéries (Wang *et al.*, 2007).

3.2. Identification protéomique par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Devant la lourdeur et le coût des nouvelles techniques de diagnostic disponibles dans les laboratoires de microbiologie, l'identification phénotypique est demeurée la règle, malgré son délai de réponse et son manque de robustesse. Le développement d'une technique alternative plus rapide et plus fiable, utilisable par tous les laboratoires de routine et sur toutes les bactéries, était toujours attendu. La spectrométrie de masse (MS : mass spectrometry), grâce à son pouvoir de résolution très élevé, a bientôt été considérée comme une technique pouvant être utile à l'identification microbienne, à la taxonomie, et à l'analyse de la composition de la cellule bactérienne. C'est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique.

3.2.1. Historique

La désorption ionisation laser assistée par matrice couplée à une analyse de temps de vol (MALDI-TOF) est une méthode d'analyse récente et en pleine expansion. Cette technique de spectrométrie de masse a connue un développement dans les années 80 et a été introduite en 1985 par Hillenkamp et Karas. En effet, ces scientifiques ont montré qu'une matrice absorbante pouvait être utilisée pour ioniser et volatiliser de petites molécules. Une révolution dans le développement de cette méthode de désorption laser a été permise par Tanaka qui a étendu l'application de cette technique aux molécules de larges poids moléculaires. Ces résultats sur l'analyse par spectrométrie de masse de protéines intactes ont fait l'objet d'un brevet en 1985, puis ont été présentés à un symposium à Osaka en 1987 et ont ensuite valu à Tanaka et Fenn l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2002. Ainsi, cet outil analytique est aujourd'hui une méthode de choix pour l'étude de composés de haute masse moléculaire, tels que les protéines, mais elle est également utilisée pour étudier les peptides, les biomolécules et, plus récemment, les microorganismes dans leur globalité. En effet, la méthode est très utilisée en bactériologie et de plus en plus développée pour l'identification microbienne à partir de bases de données. L'avantage majeur est la rapidité de la technique, puisque le résultat peut être obtenu en quelques minutes (Bouchoux et Sablier, 2005; Tanaka, 2003).

Cain *et al.* (1994) sont les premiers à avoir utilisé le MALDI-TOF. L'analyse MALDI portait sur des extraits protéiques obtenus par sonication des bactéries. Par la suite, Holland *et al.* (1996) ont réalisé les premières analyses par MALDI-TOF MS à partir de bactéries intactes. Après une croissance de 18 h sur un milieu solide, les bactéries sans aucun traitement préalable, étaient directement mélangées à la matrice avant d'être ionisées et analysées. La présence de quelques ions caractéristiques du spectre a suffi pour obtenir l'identification d'une espèce.

Depuis la fin des années 1990, de nombreuses études ont confirmé l'intérêt de cette technique (Fenselau et Demirev, 2001; Lay, 2001). On peut citer l'identification, en 1996, d'agents *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Yersinia pestis* et *Francisella tularensis* (Krishnamurthy *et al.*, 1996). La même année, Claydon *et al.* (1996) ont décrit l'identification bactérienne par MALDI-TOF de 10 micro-organismes : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, *Mycobacterium smegmatis*. En 2002, Bright *et al.* ont analysé 212 isolats appartenant à la famille des entérobactéries montrant une bonne identification d'espèce et de genre dans 84 % et 89 % des cas respectivement.

Depuis ces travaux, l'ensemble des publications concernant l'identification des bactéries, permet d'affirmer que les empreintes spectrales des principales espèces cultivables identifiées en routine ont été obtenues (Suarez, 2013). En 2009, Seng *et al.* ont identifié 1660 isolats par cette technique. Les 83,8 % de ces bactéries ont été bien identifiées jusqu'à l'espèce et 95 % jusqu'au genre. D'autres études ont été décrites, portant sur des groupes bactériens particuliers tels que les *Haemophilus* (Haag *et al.*, 1998) et les streptocoques β -hémolytiques (Kumar *et al.*, 2004).

La possibilité d'identifier plusieurs bactéries sans ambiguïté au sein d'un mélange est un des autres avantages qu'offre potentiellement la technique MALDI-TOF dans l'identification bactérienne par rapport à l'identification biochimique. Elle a été mise en évidence par Wahl *et al.* (2002), grâce à des algorithmes qui permettaient de différencier deux, trois ou quatre espèces dans un mélange d'entérobactéries, de *Bacillus spp* et de *Pseudomonas spp*. En 2003, les empreintes spectrales de 118 genres bactériens et 382 espèces étaient connus (Keys *et al.*, 2004).

3.2.2. Principe général d'un spectromètre de masse

Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse.

Un spectromètre de masse comporte toujours :

- une source d'ionisation : passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules
- un analyseur : séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge (m/z)
- un détecteur : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres.

3.2.3. Principe de la technique MALDI

La technique MALDI consiste à mélanger en excès une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec un échantillon, le mélange étant ensuite déposé sur une plaque de métal. En microbiologie, l'échantillon est le plus souvent une colonie bactérienne ou fongique, mais il est possible de déposer du matériel d'hémoculture, un échantillon d'urine ou de liquide céphalorachidien (LCR), ou encore un extrait protéique. Les cultures bactériennes ou fongiques sont prélevées et déposées directement sur la plaque en métal (une concentration est possible pour les milieux liquides).

La matrice est ajoutée au dessus de l'échantillon et la plaque est ensuite insérée dans le spectromètre de masse pour réaliser l'analyse. Le choix de la matrice est important puisqu'il s'effectue selon le type de composé analysé (Tableau 2).

Tableau 2 : Matrices utilisées selon le type de molécules analysées (Howard, 2007).

Types de molécules dans l'échantillon	Matrice utilisée
Peptides < 10kDa	Acide α cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA)
Protéines > 10 kDa	Acide sinapinique (SA) Acide 2,5 dihydroxybenzoïque (DHB)
Oligonucléotides	DHB (<10 bases) Acide 3-hydroxypicolinique (> 3500Da) Monohydrure-2,4,6-trihydroxyacetophenone (< 3500 Da)
Glycopeptides	DHB Monohydrure-2,4,6-trihydroxyacetophenone
Polymères	CHCA DHB

La matrice et l'échantillon co-cristallisent sous l'effet du séchage. L'échantillon se présente alors sous la forme d'un dépôt solide pris dans la matrice. Le mélange matrice-échantillon cristallisé est alors irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote (N₂) de longueur d'onde 337 nm dans les instruments MALDI-TOF commercialisés pour le diagnostic bactérien). Ce faisceau est dirigé sur un petit point de la surface du cristal (0,05 à 0,2 mm de diamètre). Pour obtenir un spectre correct, des centaines de tirs laser sont impulsés sur la cible pour maximiser le processus d'ionisation.

La matrice est essentielle au succès de l'ionisation de l'échantillon : en effet, l'absorption d'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne la désorption (passage en phase

gazeuse) des ions du mélange matrice-échantillon. Lors de ce passage en phase gazeuse, un transfert d'ions se fait entre les molécules de la matrice et celles de l'échantillon pour former des ions mono ou multichargés. Les ions produits par la technique MALDI sont majoritairement monochargés. Les particules à l'origine de l'ionisation sont issues de groupements carboxyliques ou hydroxyliques de la matrice, du solvant ou des molécules de l'échantillon elles-mêmes. Ainsi, les différentes protéines vont se charger positivement ou négativement en fonction de leurs structures peptidiques.

3.2.4. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF

La technique d'ionisation MALDI peut être associée à la technique TOF (Time Of Flight) ou « temps de vol ». Dans les années 60, le premier instrument de TOF a été construit et commercialisé par W. C. Wiley : le « Bendix » TOF. Ce nouveau mode d'analyse permet d'obtenir une haute résolution pour des molécules de poids moléculaires (PM) élevés (Wiley et McLaren, 1955). Il existe deux modes de système TOF pour l'analyse des bactéries : le mode linéaire et le mode réflectron. La technique du TOF linéaire est la méthode la plus utilisée pour l'analyse en microbiologie, pour des raisons de coût et de dimension de l'appareillage.

Dans la technologie MALDI-TOF (Figure 6), les ions produits par le mélange matrice-échantillon sont introduits simultanément dans un tube de vol et retenus dans une région libre avant d'être accélérés par une impulsion électrique pouvant aller jusqu'à 20 kiloélectron Volt par application d'une différence de potentiel. Cette différence de potentiel est utilisée de manière à extraire les fragments positifs ou les fragments négatifs. En microbiologie, ce sont les ions positifs qui sont le plus souvent étudiés. Les protéines ionisées passent ensuite dans le tube de vol maintenu sous vide et « volent » jusqu'à un détecteur situé à l'autre bout. Les ions sont séparés en fonction de leur vitesse et donc de leur masse, avant d'atteindre le détecteur. Le temps de vol des ions est inversement proportionnel à leur masse. Ainsi les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée et enregistrée par un multiplicateur d'électrons, puis le signal obtenu est traité informatiquement. Les protéines de l'échantillon sont analysées par un analyseur de masse, donnant un ratio masse/charge (m/z).

Cette mesure électrodynamique des ratios m/z permet de générer un spectre. Ce système de TOF linéaire peut détecter les molécules à des concentrations de l'ordre du femtomole (10^{15} mol/l) et de l'attomole (10^{18} mol/l), mais sa limitation est une mauvaise résolution, à

l'origine de l'élargissement de certains pics dans les hauts poids moléculaires. Des ions de cinétique différente peuvent ainsi avoir le même m/z .

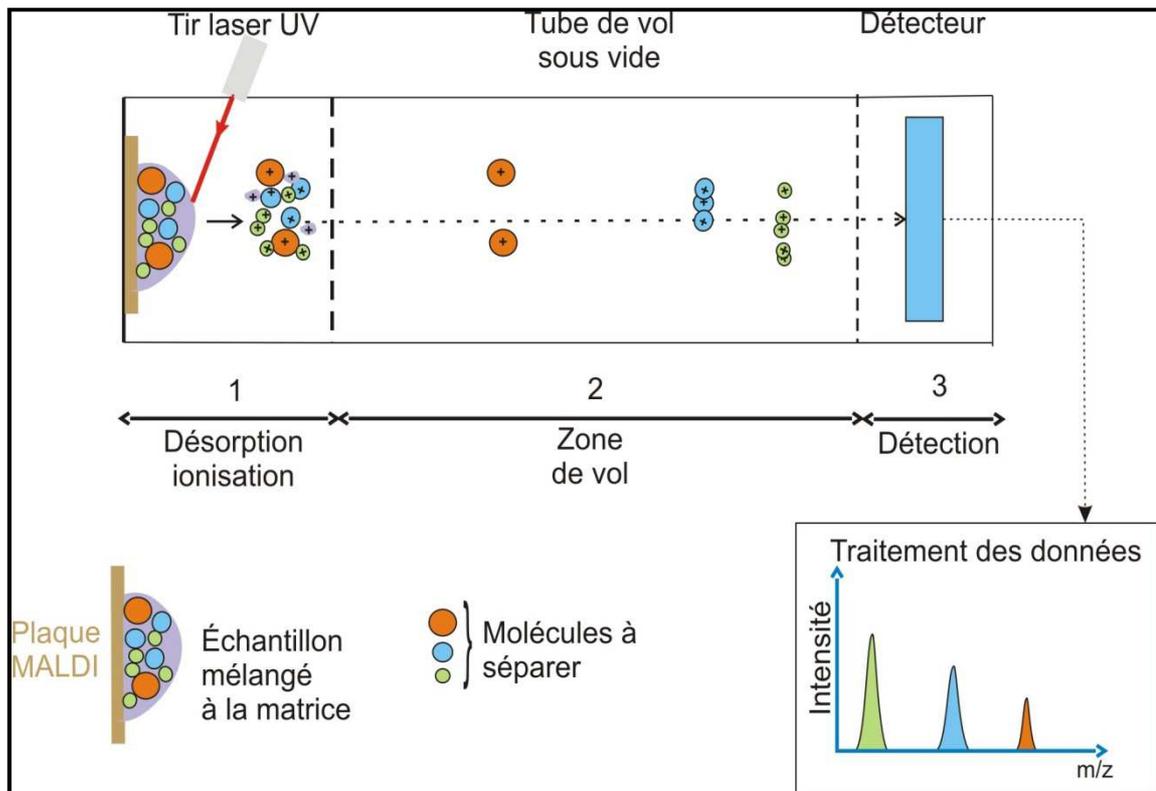


Figure 6: Fonctionnement de la technique MALDI-TOF MS¹

Le MALDI-TOF est ainsi potentiellement intéressant pour l'identification des microorganismes, à l'image des applications réalisées en bactériologie. Cependant, il est indispensable d'évaluer la faisabilité d'utiliser cette technique dans différents domaines y compris l'agroalimentaire.

La technique MALDI-TOF n'est pas un concurrent direct des techniques de référence en raison de la mesure semi-quantitative, mais paraît être un compromis intéressant notamment vis-à-vis des techniques usuelles. Elle permet d'obtenir des informations précises sur la structure primaire des composés et une connaissance de leur masse exacte. Par ailleurs, la rapidité de la technique présente un intérêt important. Les résultats peuvent être obtenus en moins d'une heure contrairement à l'identification morphologique qui nécessite plusieurs jours de culture et l'identification moléculaire nécessitant plusieurs heures d'analyse.

¹ <http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms>

3.3. Les prédictions des structures 2D des ADNr

Les ARNs, produits de transcription de l'ADN et composants très souvent monocaténares et fondamentaux pour la vie de la cellule, sont constitués d'une succession (structure 1') de nucléotides (Adénine : A, Cytosine : C, Guanine : G, Uracile : U) hétérocycliques azotés (Figure 7).

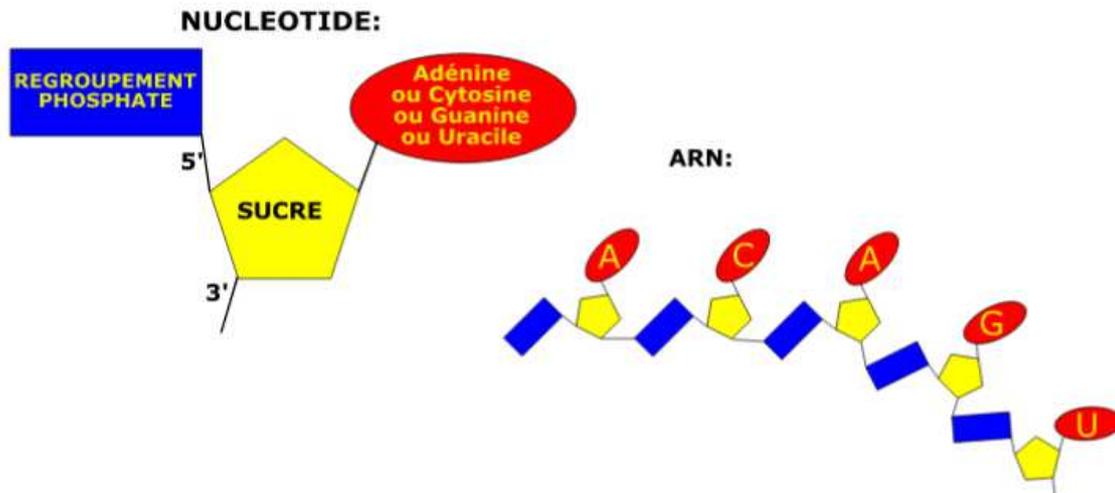


Figure 7 : Représentation schématique d'un nucléotide (à droite) et d'une chaîne d'un ARN (à gauche) (Allali J., 2004).

Usuellement, l'on distingue les ARNs suivants :

- L'ARN messager (ARNm) : issu de la transcription de l'ADN et porteurs de l'information génétique. Leur traduction donne naissance à une protéine.
- Les ARNs ribosomiaux (ARNr) : également issus de la transcription de l'ADN, sont les constituants fondamentaux des ribosomes. On distingue l'ARNr 16S, l'ARNr 18S, etc.
- Les ARNs de transfert (ARNt) : participent également dans la synthèse des protéines en collaboration avec les ribosomes.
- De nombreux autres types d'ARN sont découverts depuis les années 1990. Les snARN (small nuclear RNA) qui ont un rôle dans la maturation des transcrits primaires. Les snoARN (small nucleolar RNA) jouant un rôle dans la modification des bases dans plusieurs types d'ARN tels que les ARNr et les snARN. Les microARN de 21 à 25 pb, qui inhibent l'expression d'un gène (régulateurs de l'expression génique) en s'hybridant avec l'ARNm avec lequel ils forment des liaisons complémentaires.

Cette liaison (hybridation) inhibe la synthèse de la protéine correspondante à l'ARNm ou clive celui-ci au milieu du site de fixation du microARN (Hartmann *et al.*, 2004).

Ces quatre nucléotides, sur le brin d'ARN, ont des affinités les uns vers les autres suite à une complémentarité concrétisée par des liaisons hydrogène. L'Adénine forme deux liaisons hydrogène avec l'Uracile, alors que la Cytosine formera trois liaisons hydrogène avec la Guanine. Ces deux couples de nucléotides forment des liaisons appelées canoniques, alors que la liaison exceptionnelle entre G et U (deux liaisons hydrogène) est appelée liaison Wobble (ou liaison non canonique). L'ensemble de ces appariements non chevauchant est à l'origine de conformations spatiales (repliements) sous forme de tiges et de boucles emboîtées ou juxtaposées (Fontaine, 2009) qui confèrent aux ARNs leurs structures secondaires (structures 2') et donc leurs activités biomoléculaires (Figure 8).

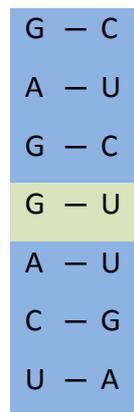


Figure 8 : Succession de liaisons Watson-Crick (en bleu) et une Wobble (en vert) formant une tige, un motif fondamental de la structure 2'.

Les éléments basiques (motifs) formés dans une structure 2' sont (Figure 9) :

- Hélice (ou tige) : suite d'appariements entre les nucléotides complémentaires. C'est la partie la plus stable du point de vue énergétique, car elle engage des paires de liaisons GC et AU, donc avec un ΔG° (Kcal/mol.) minimal.
- Boucle: Correspond à la zone des nucléotides non appariés. On peut rencontrer des boucles terminales, intérieures. Ces dernières peuvent être multiples, à partir desquelles partent au moins trois tiges.

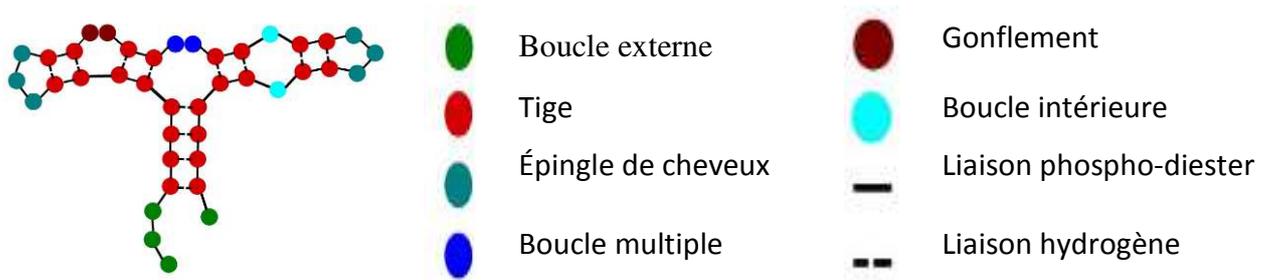


Figure 9 : Structure schématique basique des principaux motifs rencontrés dans la structure 2D des ARNr.

Dans une structure 2' de l'ARNr, les tiges présentent deux types de conformation (Figure 10) :

- Tiges emboîtées : deux tiges consécutives de même direction, séparées par une boucle interne.
- Tiges juxtaposées : deux tiges de directions différentes, parallèles ou non.

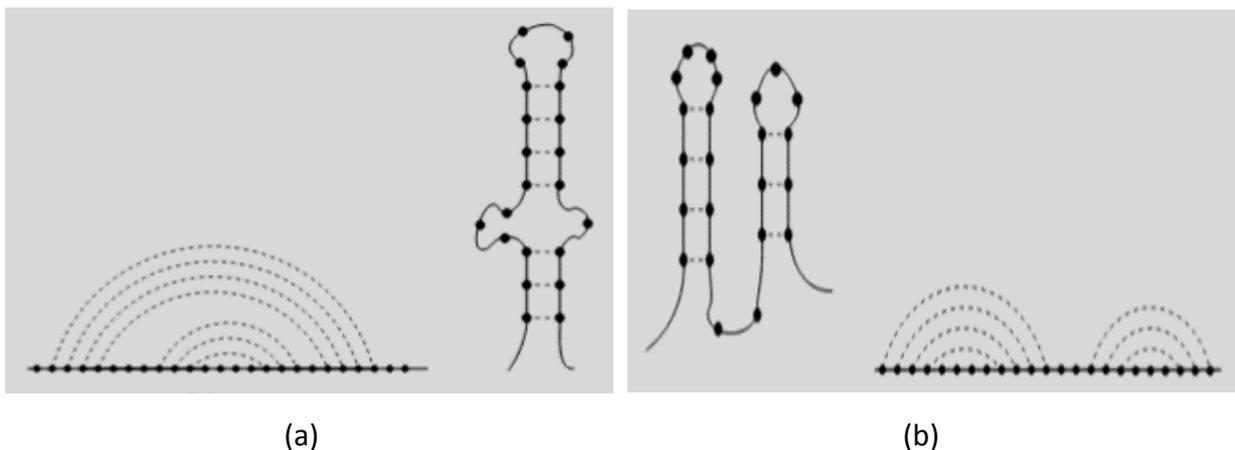


Figure 10: Différents types de conformation des tiges dans la structure 2' d'un ARNr. (a) : Tiges emboîtées ; (b) : Tiges juxtaposées (Fontaine, 2009).

Les interactions à longue distance telles que les pseudo-nœuds ou les épingles à cheveux se croisant, contribuent également à la formation de la structure secondaire de l'ARN. Cette forme d'appariement de base intramoléculaire se produit lorsqu'une région de tige ou de boucle interagit avec une autre région de tige ou de boucle non adjacente (Fallmann, 2017).

3.4. Algorithmes de prédiction de structure secondaire de base

Formellement, une structure secondaire d'ARN est simplement un graphe (étiqueté) dont les nœuds représentent des nucléotides et dont les ponts désignent des paires de bases, de sorte que :

- Les bords sont uniquement formés entre les nucléotides qui forment les paires de bases Watson-Crick et/ou Wobble (GU) ;
- Deux ponts n'émanent pas du même sommet, c'est-à-dire que, du point de vue mathématique, une structure secondaire est un matching (correspondance) ;
- Les ponts couvrent au moins trois bases ;
- Si les sommets sont placés dans l'ordre 5' vers 3' sur la circonférence d'un cercle et que les ponts sont représentés sous forme de lignes droites, il n'y aura pas deux ponts qui se croisent : le graphe est plan. Aucun pseudo-nœud.

L'approche de programmation dynamique pour la prédiction de la structure 2' de l'ARN repose sur le fait que les structures peuvent être décomposées de manière récursive en composants plus petits (motifs) avec des contributions énergétiques indépendantes. Dans chacune des étapes de décomposition, juste une seule boucle (ou empilement de deux paires de bases consécutives) est évaluée.

Afin de comparer des structures secondaires des ARNr, celles-ci sont représentées sous forme de parenthèses et de points (Figure 11). Les parenthèses représentent les paires de bases complémentaires (AU, UA, GC, CG, GU et UG) et représentent donc les tiges, alors que les points représentent les nucléotides non engagés dans une complémentarité quelconque et sont alors synonymes de boucles, de gonflements, etc.

```

      G   G   G   A   C   A   A   U   C   C
      .   (   (   (   .   .   .   )   )   )
  
```

Figure 11 : Exemple d'une annotation sous format de parenthèses d'une structure 2D.

De telles expressions de parenthèses imbriquées ont une interprétation naturelle en tant qu'arbres enracinés et ordonnés en bioinformatique. En conséquence, les algorithmes d'alignement et d'édition d'arbres, qui généralisent les méthodes d'alignement de séquences bien connues, peuvent être adaptés pour comparer les ARN en fonction de leurs séquences et de leurs structures (Höchsmann *et al.*, 2003).

Une autre approche de comparaison est le repliement et l'alignement simultanés. Dans ce cas, la qualité de la prédiction 2D augmente considérablement car la structure est calculée à partir d'un alignement de séquences apparentées. Cependant, Bien que les méthodes d'alignement de séquence traditionnelles permettent d'aligner suffisamment des séquences de similarité élevée, de tels alignements ont tendance à devenir inexacts, lorsque les identités par paire tombent au-dessous de 60% environ ; compromettant ensuite la prédiction comparative de structures 2D (Fallmann, 2017).

La prédiction 2D inclut toujours une certaine incertitude, en fonction de la méthode de prédiction 2D à adopter. Il est alors important d'obtenir des informations sur la fiabilité de cette prédiction (Lorenz, 2016). L'entropie (méthode de l'énergie libre minimale) détermine, par exemple, si un nucléotide se trouve principalement apparié ou non apparié. Par rapport à cette méthode, la méthode utilisant les calculs de centroides fait moins de 30,0% d'erreurs de prédiction, mesurés par la valeur prédictive positive avec une sensibilité légèrement améliorée, mais les temps de calculs restent très longs (Ding, 2005).

Une collection des logiciels les plus pertinents axés sur les prédictions 2D de l'ARN est disponible sur la toile (tableau 3).

Tableau 3 : Outils et suites centrés sur l'ARN

Outil/Suite	Description	URL	Citation
ViennaRNA	Le Package ViennaRNA comprend une librairie C et un ensemble de programmes autonomes liés à la structure 2D des ARN traitant des sujets tels que la prédiction de structure optimale et consensus, l'analyse d'interaction ARN – ARN, l'évaluation de l'énergie libre, l'identification de repliements et les alignements. Il comprend des outils de ligne de commande tels que RNAfold, RNAplfold et RNAalifold	http://rna.tbi.univie.ac.at/	Lorenz <i>et al.</i> , 2011
Freiburg RNA tools	Ces outils permettent d'accéder à une série de programmes de recherche sur l'ARN pour les alignements séquence-structure (LocARNA, CARNA), le regroupement (ExpaRNA), la prédiction d'interaction (IntaRNA, CopraRNA), l'identification des homologues (GLASSgo), et la conception de séquence (AntaRNA, INFORNA).	http://rna.informatik.uni-freiburg.de/	Smith <i>et al.</i> , 2010
RNAsoft	RNAsoft est une collection de services en ligne pour la prédiction et la conception de structures ARN / ADN. Il donne accès à PairFold, CombFold et RNA Designer.	http://www.rnasoft.ca/	Andronescu <i>et al.</i> 2003
mfold/UNAFold	Logiciel de prédiction du repliement et de l'hybridation d'acides nucléiques. Il fournit des méthodes de repliement d'ARN ou d'ADN simple brin ou d'hybridation entre brins. Il peut calculer des fonctions de partition, des repliements ou des hybridations d'énergie libre minimale ainsi que des repliements sous-optimaux.	http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold	Zucker, 2003

En fin, l'intégration de données expérimentales (séquences) doit être traitée avec précaution, car rien ne garantit que les prévisions deviennent effectivement plus précises. Cependant, les outils et les suites présentés ici permettent de faire des investigations sur pratiquement tous les aspects de la structure secondaire de l'ARN et de ses caractéristiques en combinant les résultats de ces programmes. Dans un effort de collaboration, plusieurs de ces outils ont également été rassemblés dans l'atelier Galaxy-RNA (<https://usegalaxy.org/>), ce qui les rend disponibles dans une boîte virtualisée, avec une interface facile à utiliser de la marque Galaxy.

Partie expérimentale

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans notre travail, une série d'analyses microbiologiques d'ordres sanitaires sont effectués pour évaluer la qualité du lait tout le long de son processus de fabrication : de la matière première (poudre de lait et eau de reconstitution) passant par les produits intermédiaires (lait reconstitué avant pasteurisation, lait reconstitué pasteurisé) au produit fini (lait reconstitué pasteurisé conditionné en sachets). Les méthodes d'analyses bactériologiques employées dans ce travail sont toutes normalisées pour la recherche, le dénombrement et l'identification des bactéries.

Dans tout ce qui suivra, le critère bactériologique désignera un caractère de jugement de l'acceptabilité d'un produit fini ou intermédiaire ou même d'un procédé de fabrication, se basant sur la présence voire l'absence et le nombre de germes particuliers tels les pathogènes responsables de toxi-infections.

1. Prélèvement des échantillons de lait

Au total, trois prélèvements d'échantillons de lait reconstitué pasteurisé collectés à différentes étapes de leur processus de fabrication (Figure 12) : avant pasteurisation (matières premières et lait reconstitué), après pasteurisation et le produit fini, dans une unité de production de lait et produits dérivés SARL SUILAIT au nom commercial « PALMA NOVA » située à Constantine. L'échantillonnage a été effectué en février 2015 sur une période de trois semaines consécutives à raison d'un prélèvement par semaine.

L'échantillonnage est réalisé suivant la réglementation Algérienne en vigueur (NA2394 :1995/NA762 :1991) (Annexe A). Suite à la diversité des produits à analyser (poudre de lait, eau de reconstitution, lait reconstitué et reconstitué pasteurisé), nous avons eu recours à des techniques de prélèvement en fonction de la nature du produit (Tableau 4). Précisons que les échantillons liquides (lait reconstitués avant et après pasteurisation et eau de reconstitution) ainsi que la poudre de lait faisant l'objet d'analyses microbiologiques sont recueillis de manière très aseptique dans des flacons (récipients) et sacs stériles, immédiatement conservés au frais, dans une glacière, et transportés jusqu'au laboratoire où ils sont traités sur place.

Les données relatives à la traçabilité de la poudre de lait destinée à la reconstitution sont représentées dans le tableau en annexe A.

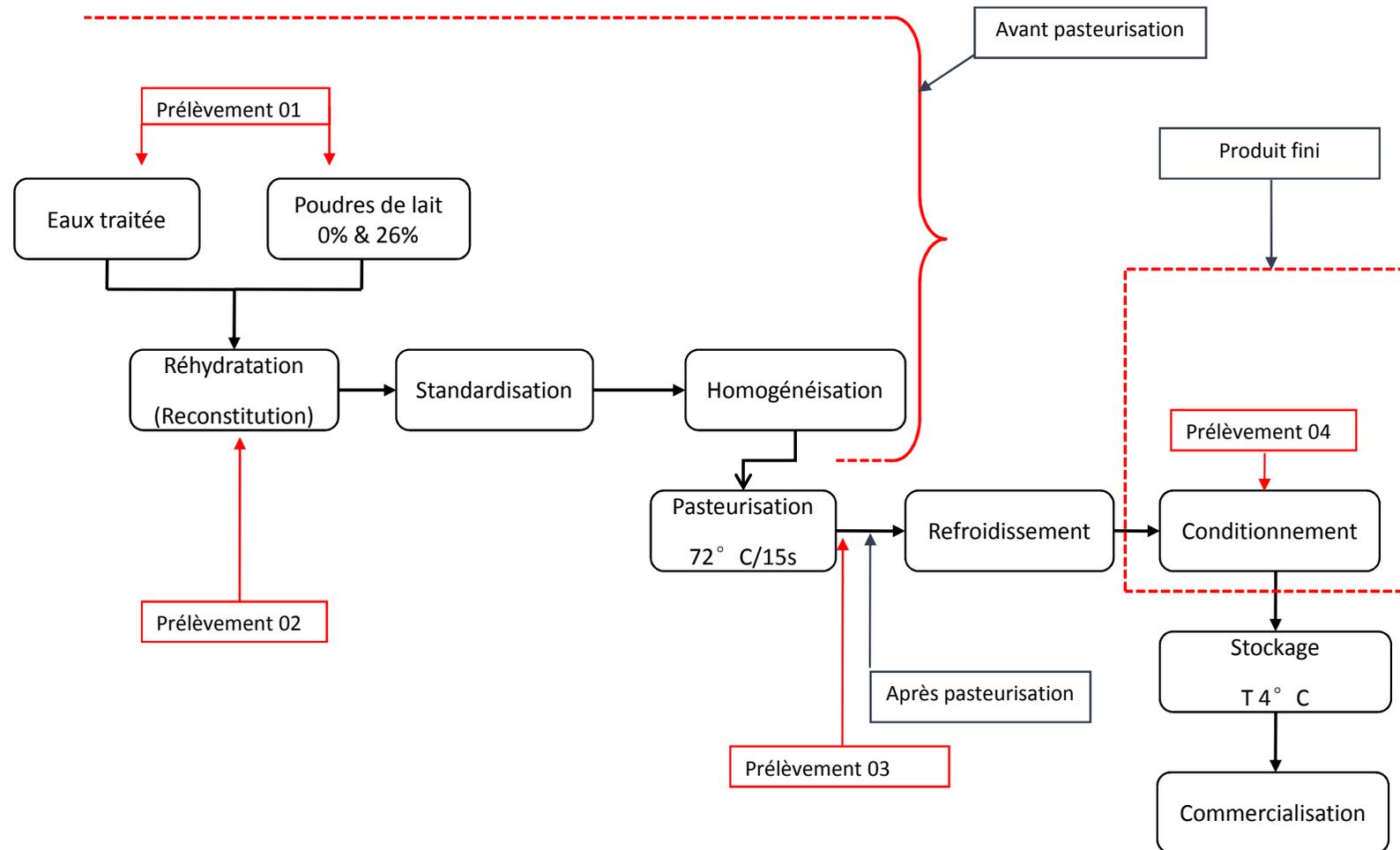


Figure 12 : Diagramme de fabrication du lait reconstitué pasteurisé et sites de prélèvements des échantillons .

Tableau 4 : Techniques et sites de prélèvement des échantillons.

Echantillon		Site de prélèvement	Technique de prélèvement	Quantité prélevée
Matières premières	Eau de reconstitution	Robinet du tank de lancement	Prélèvement après flambage du robinet. Laisser couler l'eau quelques secondes puis recueillir dans un flacon stérile.	250 mL par unité échantillonnée
	Poudre de lait (0% et 26%)	Sac en polyéthylène de 25 kg hermétiquement fermé doublé en papier carton	Prélèvement à l'aide d'une spatule stérile.	25 g de poudre pour chaque unité échantillonnée
Lait reconstitué avant pasteurisation		Tank de reconstitution	Nettoyage et désinfection de la vanne à l'alcool puis flambage. Prélèvement à l'aide d'une seringue stérile	250 mL par unité échantillonnée
Lait reconstitué après pasteurisation		Sortie pasteurisateur	Nettoyage et désinfection du robinet de la sortie du pasteurisateur. (Cautérisation) Prélèvement à l'aide d'une seringue stérile	250 mL par unité échantillonnée
Lait reconstitué pasteurisé conditionné		Sortie de la conditionneuse	Mélange du lait de 5 sachets après désinfection de leur surface à l'alcool.	250 mL du mélange de 5 sachets

2. Traitement des échantillons

2.1. Préparation des solutions mères

- Poudre de lait : Introduire aseptiquement 25 grammes de poudre de lait dans un flacon stérile de 225 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT). Cette suspension constitue alors la solution mère qui correspond à la dilution au $1/10^{\text{ème}}$.
- Lait reconstitué pasteurisé : Procéder de façon aseptique à mélanger cinq sachets pris aléatoirement parmi les lots de lait produits.

2.2. Préparation des dilutions

Des dilutions sont réalisées en cascade jusqu'à la dilution 10^{-3} à partir de la solution mère de la poudre de lait. De même, une série de dilutions est réalisée à partir de 1mL du mélange des laits, préparé précédemment jusqu'à la dilution 10^{-6} .

3. Analyses microbiologiques des échantillons

Les analyses microbiologiques sont effectuées, selon les techniques décrites par :

- Les normes Algériennes (IANOR) (Annexe B).
- Les normes de l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO) (Annexe B).

Afin d'évaluer la qualité hygiénique des échantillons de laits (décrits ci-dessus), ces derniers ont fait l'objet d'analyses microbiologiques visant la détection et le dénombrement des microorganismes d'altération (flores mésophiles, Coliformes) et les microorganismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires (Staphylocoques, Salmonelles, Streptocoques, *Clostridium* sulfito-réducteurs), rencontrés dans l'industrie laitière. Les flores recherchées pour chaque produit sont présentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Flores bactériennes recherchées pour les différents produits retenus pour l'analyse microbiologique.

Produit analysé	Flores recherchées	Référence
Poudres de lait (0% et 26%)	<ul style="list-style-type: none"> - Germes aérobies à 30 °C - Coliformes - Clostridium sulfito-réducteurs à 46 °C - Salmonella 	JORADP* N° 35 du 27mai1998/ JORADP* N° 19 du 2 avril 2000.
Eau de reconstitution (traitée)	<ul style="list-style-type: none"> - Germes aérobies à 37 °C - Germes aérobies à 22 °C - Coliformes totaux à 37 °C - Coliformes fécaux - Streptocoques D - Clostridium sulfito-réducteurs à 46 °C 	JORADP* N° 35 du 27mai1998.
Lait reconstitué et reconstitué pasteurisé conditionné.	<ul style="list-style-type: none"> - Germes aérobies à 30 °C - Coliformes totaux - Coliformes fécaux - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Salmonella</i> 	JORADP* N° 35 du 27 mai1998. JORADP* N° 70 du 7 novembre 2004.

(*) JORADP : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire.

4. Identification des isolats bactériens

Seulement les boîtes de Petri contenant la gélose (PCA) et la gélose Baird Parker (BP), utilisées respectivement pour le dénombrement de la flore aérobie mésophile et la recherche de *Staphylococcus aureus*, sont positives (croissance visible). Une seule colonie typique de chaque boîte (PCA et BP) est sélectionnée pour cette étude. La sélection des colonies mésophiles (poussant sur PCA) est basée sur leurs caractéristiques de forme et de couleur à partir des boîtes dénombrables (10 à 300). Des colonies avec morphologie typique de *Staphylococcus* sur milieu BP (noires, convexes et avec ou sans halo) sont retenues. Ensuite, les colonies sélectionnées sont repiquées sur les mêmes milieux pour s'assurer de la pureté des espèces. Ces dernières sont soumises à une série de tests d'identification phénotypique, protéomique et génotypique.

La codification adoptée pour les isolats est de type alphanumérique (Bi et Ci). Les lettres B et C désignent respectivement Bacille et Cocci ; alors que les individus numériques (i) indiquent le numéro de l'isolat.

4.1. Identification phénotypique

L'identification phénotypique des isolats est réalisée en se basant sur l'étude des caractères cultureux, morphologiques et physio-biochimiques suivants :

- Coloration de Gram.
- Coloration de la spore.
- Recherche des enzymes respiratoires (catalase et oxydase).
- Mobilité à 37 °C.
- Utilisation du mannitol.
- Utilisation des sucres Saccharose et lactose.
- Production de gaz en glucose et d'H₂S.
- Recherche des activités hémolytique, amylolytique et protéolytique.

4.2. Identification protéomique par MALDI-TOF

L'identification des isolats par analyse de leurs protéomes par spectrométrie de masse MALDI-TOF est effectuée comme décrit par Seng *et al.*, 2009. Elle est réalisée sur un spectromètre Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Allemagne) muni d'un logiciel FlexControl (version 3.0) (Bruker Daltonics) pour l'acquisition automatique de spectres de masse en mode positif linéaire dans une plage de 2 à 20 kDa, selon les instructions du fabricant.

L'analyse des données spectrales brutes est réalisée par le logiciel d'automatisation MALDI BioTyper (version 2.0) (Bruker Daltonics) ; il utilise une base de données contenant des spectres de référence. La valeur du score est définie par trois composantes :

- les appariements du spectre inconnu par rapport au spectre principal,
- les appariements des pics du spectre principal par rapport au spectre inconnu
- la corrélation des intensités des pics appariés.

Cela conduit à un premier score, de 0 (pas de correspondance) à 1,0 (identité parfaite), qui est converti en un score entre 0 et 3. Un score supérieur à 2,0 indique une bonne identification au niveau des espèces, alors que des scores au-dessus de 2,3 correspondent à une excellente identification au niveau de l'espèce. Les valeurs comprises entre 1,7 et 2,0 correspondent à une identification fiable au niveau du genre et les valeurs inférieures à 1,7 indiquent une absence d'identification (pas de similarité significative) (Cherkaoui *et al.*, 2010).

La préparation de l'échantillon est réalisée conformément aux instructions de Bruker Daltonics. Les isolats bactériens sont cultivés sur gélose Columbia à 5% de sang de mouton (COSBA) et incubés pendant 24 heures à 37 °C. La colonie est directement déposée sur une plaque cible MSP 96 (Bruker Daltonics). La préparation est recouverte avec 1,5µL de solution de matrice HCCA, qui est une (solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique dans 50 % d'acétonitrile - 2,5% d'acide trifluoroacétique) (Annexe D). La colonie est ensuite séchée à l'air libre à température ambiante pour permettre la co-cristallisation avec l'échantillon expérimental. Chaque isolat est mesuré deux fois à partir de trois boîtes d'agar indépendantes. Au moins deux répétitions indépendantes sur trois doivent être concordantes pour être considérées comme valables pour l'identification d'espèces ou de genres.

Les spectres acquis par le spectromètre de masse sont ensuite comparés en utilisant le logiciel BioTyper.

4.3. Identification géotypique

4.3.1. Amplification par PCR standard du gène de l'ADNr 16S

- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN des souches isolées est réalisée avec le kit de tissu d'ADN (QIAGEN, Hilden, Allemagne) en utilisant l'instrument EZ1 (QIAGEN). Les échantillons sont préparés selon la procédure appropriée, décrite dans l'ADN EZ1 Manuel de tissu, avec

un volume de départ de 200 µL. Les colonies de chaque isolat sont mélangées avec 180 µL de tampon d'extraction et 20 µL de protéinase K puis incubées à 56 °C pendant une nuit. L'extraction dure 15 min. Le tampon et la protéinase K permettent d'éliminer les protéines et libérer les acides nucléiques, qui sont ensuite capturés par les particules magnétiques. Le complexe est lavé plusieurs fois. Lors de l'éluat, l'éluât se détache des billes et celles-ci sont capturées par un système d'aimantation qui les retient. Les éluats contenant les ADN génomiques sont alors récupérés dans des microtubes stériles. L'ADN extrait peut être analysé immédiatement après l'extraction ou conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

- Amplification de l'ADN génomique par PCR

La PCR (Standard) consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S de nos isolats à l'aide d'amorces spécifiques fD1 et rP2 (Tableau 6) générant un amplicon de 1500 bp (Weisburg *et al.*, 1991).

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur Biometra (LABGENE scientifique Instruments, Archamps, France). Le mélange réactionnel d'amplification d'un volume final de 25 µL contient :

- 5 µL d'ADN extrait,
- 13 µL d'eau ultra pure
- 2,5 µL de tampon de PCR 10X,
- 1 µL MgCl₂ 15 mM (Applied biosystems, Courtaboeuf, France)
- 2,5 µL de désoxyribonucléotides-triphosphate (dNTP, 2,5 mM : dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
- 0,5 µL d'amorce sens (fD1, 10 µM)
- 0,5 µL d'amorce anti-sens (rP2, 10 µM)
- 0,25 µL de Taq-ADN polymérase (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Les différentes étapes de la PCR standard comprennent une étape de dénaturation initiale de l'ADN double brin pendant 5 min à 95 °C. Cette étape est suivie de 39 cycles d'amplification de l'ADN avec

- 60 s à 94 °C (Dénaturation),
- 50 s à 55 °C (Appariement des amorces : hybridation)
- 1 min et 30 s à 72 °C (Elongation, temps variable selon la taille du fragment à amplifier).

Une étape finale de 7 min à 72 °C permet de terminer la synthèse des brins inachevés.

- Contrôle de l'amplification

Après polymérisation des gènes *ADNr 16S*, les échantillons sont contrôlés sur un gel d'agarose à 1,5 %, contenant du SYBERSafe, agent intercalant, dans une cuve de migration contenant du tampon Tris-Borate-EDTA (Ethylene-Diamine Tetra-acetic Acid) : TBE 0.5X. Dans chaque puits 5 μ L de produit PCR additionnées à 2 μ L de bleu de tampon de charge sont déposés, puis une migration, pendant 20 min à 135 volts. Le 1 Kb stepladder (Promega, USA) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire. Le gel est examiné sous UV pour repérer les bandes amplifiées et les photographier à l'aide d'un transilluminateur à UV.

Tableau 6: Amorces utilisées pour le séquençage de l'*ADNr 16S*.

	Amorces	Séquences	Taille (pb)	Tm (°C)	Références
PCR Standard	fD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	20	56	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	21	62	
PCR BigDye	536F	CAGCAGCCGCGGTAATAC	18	58	(Drancourt, Bollet, <i>et Raoult</i> , 1997)
	536R	GTATTACCGCGGCTGCTG	18	58	
	800F	ATTAGATACCCTGGTAG	17	48	
	800R	CTACCAGGGTATCTAAT	17	48	
	1050F	TGTCGTCAGCTCGTG	15	48	
	1050R	CACGAGCTGACGACA	15	48	

- Purification sur plaque Sephadex

Les produits amplifiés sont ensuite purifiés par gel-filtration sur des plaques MultiScreen de Millipore. La résine Sephadex® G50 utilisée permet de dessaler les échantillons et d'éliminer les nucléotides non incorporés et les amorces de PCR en excès. La plaque 96 puits MultiScreen HV (Multiscreen Filter Plates MAHVN4550) est utilisée comme support inerte de la résine G50 (Gel sephadex G50 Sigma Aldrich). Les puits de la plaque MultiScreen HV, sont chargés par la résine sèche Sephadex® G-50 Superfine en utilisant le chargeur de colonne de 45 μ L comme suit : la résine Sephadex® G-50 est déposée dans chaque puits du chargeur de colonne, l'excès de résine est retiré avec une raclette, la plaque MultiScreen HV est alors placée à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir, l'ensemble est enfin retourné. 300 μ L d'eau ultra pure sont alors ajoutés dans chaque puits contenant de la résine, la plaque est fermée avec son couvercle et laissée 3 h à température ambiante. Une fois les mini-colonnes

gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être stockées à 4 °C. Pour l'utiliser, la plaque MultiScreen HV est alors placée sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits. L'ensemble est centrifugé 5 minutes à 1200 g pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes.

Après avoir ajouté 10 µL d'eau ultra pure aux échantillons à purifier, déposer-les délicatement au centre des mini-colonnes. Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de polypropylène au format standard 96 et centrifuger 5 min à 1200 g. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

4.3.2. Séquençage du gène *ADNr 16S*

Le séquençage est réalisé à l'aide d'un automate ABI-3130XL Genetic Analyser. Le résultat est présenté sous forme d'un chromatogramme. Les séquences des fragments obtenus par les six amorces utilisées, sont des séquences qui se recouvrent en partie. À l'aide de ces parties communes entre les séquences lues, nous pouvons reconstituer la séquence consensus. Cette opération d'assemblage est réalisée par le logiciel Sequencher 4.1.4. Les séquences sont ensuite comparées aux séquences homologues des banques de données nucléiques de séquences à travers le portail NCBI¹ en utilisant le programme BlastN.

5. Alignement multiple et Analyse phylogénétique

L'alignement multiple des séquences est réalisé en utilisant le logiciel MUSCLE 3.7 L'arbre phylogénétique est construit avec le logiciel Phy ML 3.0, selon la méthode du maximum de vraisemblance. Les deux programmes (MUSCLE 3.7 et Phy ML 3.0) sont disponibles à l'URL : http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/index.cgi

6. Analyse bioinformatique des gènes *ADNr 16S*

L'analyse bioinformatique a concerné les séquences nucléiques des gènes *ADNr16S*. Pour le cas des séquences *ADNr 16S*, un BlastN est réalisé pour confirmer la place systématique des 5 isolats par estimation de leurs homologies avec les séquences de la base de données GenBank. La prédiction de la structure 2D de ce gène est réalisée selon la méthode des énergies libres (ΔG°) en utilisant le programme bioinformatique mfold disponible à l'URL : <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>

¹ <http://www.ncbi.gov/Blast.cgi>

Résultats & discussion

1. RÉSULTATS

1.1. Analyses microbiologiques

1.1.1. Evaluation de la qualité hygiénique des échantillons de lait

Les résultats des analyses microbiologiques, visant à évaluer la qualité hygiénique des échantillons de lait effectuées sur les matières premières (poudre de lait et eau de reconstitution), le lait reconstitué (avant pasteurisation), le lait reconstitué pasteurisé et le lait reconstitué conditionné (produit fini) sont comparés aux critères microbiologiques des denrées alimentaires fixés par le JORADP N°35 du 27 mai 1998 (Annexe C).

- Matières premières (poudre de lait et eau de reconstitution)

Les tableaux 7 et 8 représentent les résultats microbiologiques des matières premières :

-Poudre de lait : Pour les trois prélèvements effectués sur les poudres de lait (en moyenne un prélèvement par semaine), seuls les germes aérobies mésophiles sont dénombrés. Ces derniers varient entre 10 et 200 pour certains échantillons et absents pour d'autres. Cependant, nous avons enregistré une absence totale des autres germes recherchés à savoir : les Coliformes totaux, les sulfito-réducteurs et les Salmonelles.

Tableau 7: Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur la poudre de lait destinée à la transformation.

Echantillons		Flores recherchées et dénombrées en UFC/MI			
		Germes aérobies mésophiles	Coliformes totaux	Sulfito-réducteurs	<i>Salmonella spp</i>
E1	PL 0%	00	00	00	abs
	PL26%	00	00	00	abs
E2	PL0%	00	00	00	abs
	PL26%	2x10 ²	00	00	abs
E3	PL0%	10	00	00	abs
	PL26%	00	00	00	abs

E : échantillon ; PL : poudre de lait ; abs : absence.

-Eau de reconstitution : L'eau utilisée pour la reconstitution du lait doit être propre à la consommation, c'est-à-dire contenir une flore banale réduite, qui ne doit pas excéder 20 UFC/mL à 37 °C, et ne pas contenir des microorganismes pathogènes (JORADP N° 35, 1998).

Pour les trois échantillons, les résultats obtenus (tableau 8) montrent que le nombre de germes aérobies mésophiles à 37 °C et 22 °C n'excède pas les valeurs exigées par les normes Algériennes (<20 et <10² respectivement). De plus, aucune présence des Coliformes (totaux et fécaux), de Streptocoques D et de *Clostridium* sulfito-réducteurs n'a été constatée. De ce fait, nous pouvons dire que tous les échantillons, présentent des analyses conformes et leur qualité est considérée comme satisfaisante pour une éventuelle utilisation industrielle (reconstitution du lait).

Tableau 8 : Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur l'eau de reconstitution.

Echantillons		Flores recherchées et dénombrées en UFC/mL					
		Germes aérobies à 22 °C	Germes aérobies à 37 °C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Streptocoques du groupe D	<i>Clostridium</i> sulfito-réducteur à 46 °C
E1	ER	09	07	00	00	00	00
E2	ER	04	02	00	00	00	00
E3	ER	05	03	00	00	00	00

E : échantillon ; ER : eau de reconstitution

- Le lait reconstitué avant et après pasteurisation et le produit fini :

Le tableau 9 indique les résultats d'analyses microbiologiques effectuées sur les prélèvements du lait reconstitué, du lait reconstitué pasteurisé et du produit fini.

Les résultats montrent l'absence totale des germes pathogènes tels que les Salmonelles, les Coliformes totaux et fécaux et les *Clostridium*s sulfito-réducteurs) ; des *staphylococcus aureus* à l'exception de la détection d'une contamination par des staphylocoques à coagulase négative qui a été observée dans tous les échantillons de lait reconstitué avant pasteurisation. Cependant, ils montrent la présence des germes aérobies mésophiles à 30 °C dans la plupart des échantillons testés avec un faible dénombrement variant entre 30 et 10⁴ UFC/mL et leur absence totale dans les échantillons de lait reconstitué à la sortie du pasteurisateur ; ce qui

témoigne de l'efficacité du traitement de pasteurisation. Selon la réglementation en vigueur, le nombre de germes totaux retrouvés est tolérable, car il est en dessous des valeurs de m et M, (sachant que m est égal à 3.10^4 UFC/mL, un seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante, et M, qui est égal à 10^6 représentant le seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, sans pour autant que le produit soit considéré comme toxique (JORADP N°35, 1998). Face à ces résultats, nous pouvons alors confirmer que l'ensemble des valeurs obtenues ne sont pas totalement satisfaisantes, et par conséquent les échantillons soumis aux analyses sont conformes à l'exception de ceux dont la contamination par des staphylocoques à coagulase négative a été détectée.

Tableau 9: Résultats d'analyses microbiologiques des prélèvements effectués sur le lait reconstitué avant pasteurisation et le lait reconstitué pasteurisé.

Echantillons		Germes aérobies à 30 °C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella spp</i>
E1	LAP	10^2	00	00	abs	abs
	LP	00	00	00	abs	abs
	PF	30	00	00	abs	abs
E2	LAP	3.10^2	00	00	abs	abs
	LP	00	00	00	abs	abs
	PF	10	00	00	abs	abs
E3	LAP	10^2	00	00	abs	abs
	LP	00	00	00	abs	abs
	PF	00	00	00	abs	abs

E : échantillon ; LAP : lait avant pasteurisation ; LP : lait pasteurisé ; PF : Produit Fini ; abs : absence.

1.1.2. Caractérisations phénotypique et biochimique des isolats bactériens

Douze isolats bactériens (issus de l'isolement sur milieu PCA et BP) sont caractérisés partiellement en utilisant une gamme de tests phénotypiques, biochimiques ainsi qu'une coloration différentielle de Gram (Tableau 10).

Tableau 10 : Résultat des tests phénotypiques et biochimiques des isolats bactériens.

Test \ Isolat	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	C1	C2	C3	C4	C5
Gram	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Forme des cellules	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Catalase	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Oxydase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Saccharose	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
Lactose	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gaz en Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mobilité	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
Mannitol	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Spore	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
Hémolyse	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
Proteolyse	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1
Amilolyse	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0

Tests biochimiques /1: Test positif ; 0 : Test négatif ;

Forme des cellules / 0 : Cocci ; 1 : Bacille.

L'observation microscopique après coloration de Gram a révélé que 60 % (n/N) des isolats sont des bacilles formant des spores et seulement 40 % sont des cocci, tous à Gram positif (Tableau 10).

D'après le tableau 10, le résultat de la mise en évidence des enzymes respiratoires a révélé que tous les isolats sont catalase positive et oxydase négative à l'exception de l'isolat C5 qui en plus d'une catalase possède également une oxydase.

En ce qui concerne l'utilisation des sucres saccharose et lactose, les résultats montrent une nette variabilité vis-à-vis de la capacité de dégradation de ces deux sucres par les douze isolats. Cependant aucun dégagement de gaz ni production d'H₂S sont notés et ceci pour tous les isolats.

Il apparaît également du tableau 10 que tous les coques isolés (C1, C2, C3, C4, C5) sont immobiles et incapables de fermenter le mannitol. Cependant, la plupart des bacilles sont mobiles et incapables de fermenter le mannitol.

Il ressort du tableau 10, que l'ensemble des isolats de forme bacillaire sont capables d'hydrolyser l'amidon ; ce qui signifie que ces dernières possèdent une amylase. L'hydrolyse de l'amidon s'exprime par un halo d'éclaircissement autour des colonies sur gélose à l'amidon. De même, nos isolats possèdent également une protéase, la caséinase ; enzyme qui hydrolyse la caséine du lait. Celle-ci est mise en évidence par la formation d'un halo clair autour des colonies, sur gélose au lait, justifiant la dégradation de la caséine. Cependant une absence de ces activités est notée chez tous les coques isolés à l'exception de l'isolat C5 qui possède une activité protéolytique.

Il ressort également que seuls les isolats notés B1, B5, B6, B7 parmi les bacilles et les isolats C2, C3 et C4 parmi les coques ont la capacité à induire une hémolyse sur le milieu gélose au sang de mouton 5%. Les colonies apparaissent grisâtres, autour d'une zone d'hémolyse claire. Ceci résulte de l'oxydation de l'hémoglobine en méthémoglobine par le peroxyde d'hydrogène sécrétée par les bactéries.

Les résultats de l'identification phénotypique sont utilisés pour établir les liens phylogénétiques entre les douze isolats bactériens (Figure 13). L'arbre phylogénétique est réalisé en utilisant le programme Spss de IBM V.25.0, selon la méthode des carrés de la distance Euclidienne (Méthode de Ward).

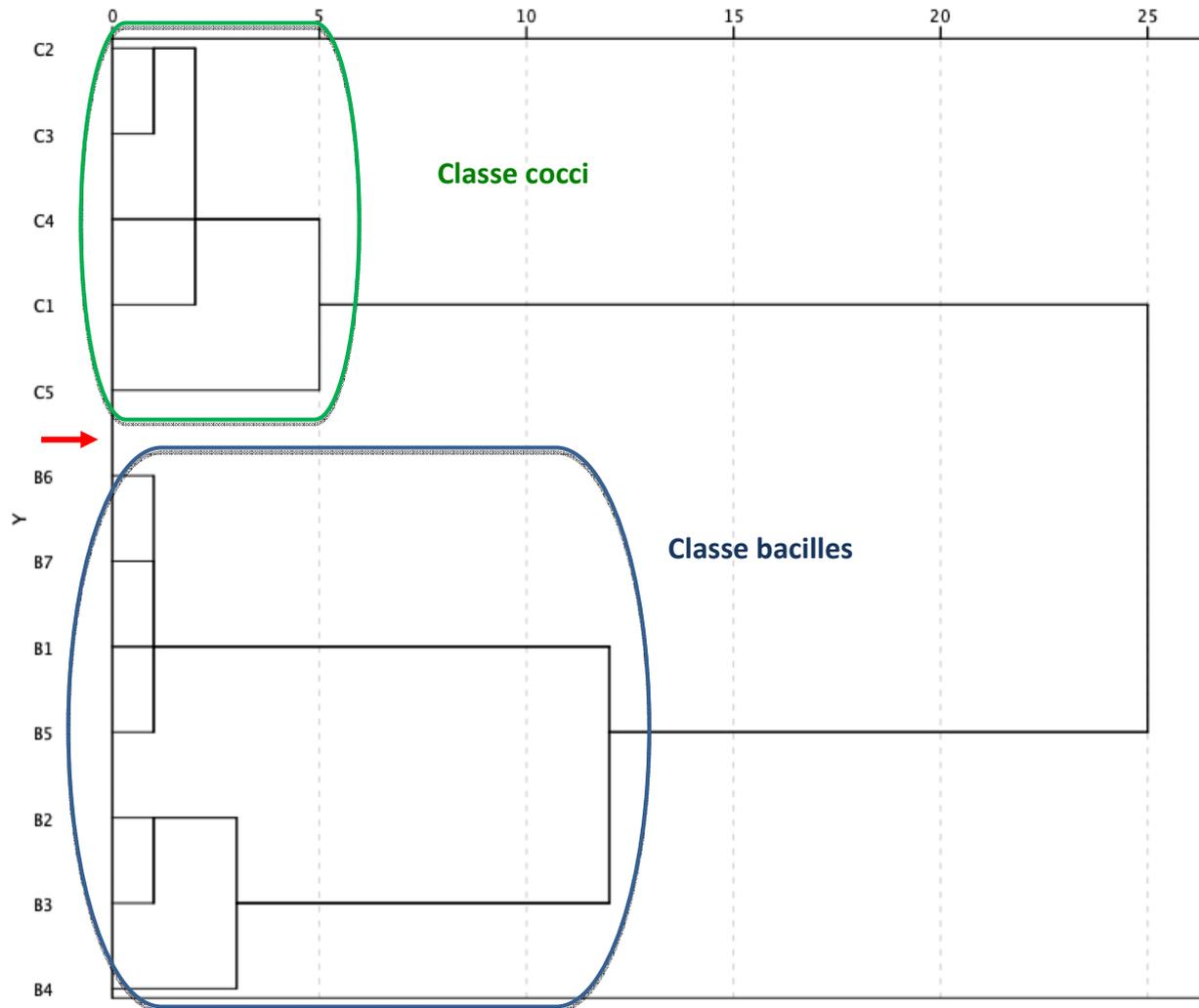


Figure 13 : Dendrogramme des douze isolats construit avec la méthode des carrés de la distance Euclidienne. La flèche au milieu indique la discrimination des deux principaux groupes.

1.2. Identification protéomique par MALDI-TOF MS

Les douze isolats bactériens ont fait l'objet d'une analyse protéomique de type MALDI-TOF MS. Cette analyse a donné des spectres satisfaisants pour l'identification des espèces. Comme l'illustre la figure 14, les profils MALDI-TOF MS pour la plupart des isolats diffèrent nettement en termes de nombre et d'intensité des signaux de masse d'un isolat à un autre. Les profils obtenus sont comparés aux spectres de référence de la base de données BioTyper et leur similarité est exprimée en un Log score par le BioTyper. Comme le montre le tableau 11, tous les isolats ont été identifiés au niveau de l'espèce (scores ≥ 2).

Tableau 11 : Scores d'identification par MALDI-TOF MS des 12 isolats.

Isolat	MALDI-TOF		
	Résultat	Niveau d'identification	Score
B1	<i>Bacillus cereus</i>	Espèce	2,181
B2	<i>Bacillus subtilis</i>	Espèce	2,124
B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	Espèce	2,179
B4	<i>Bacillus pseudomycoide</i>	Espèce	2,109
B5	<i>Bacillus cereus</i>	Espèce	2,166
B6	<i>Bacillus cereus</i>	Espèce	2,135
B7	<i>Bacillus cereus</i>	Espèce	2,174
C1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Espèce	2,213
C2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Espèce	2,164
C3	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Espèce	2,250
C4	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Espèce	2,100
C5	<i>Macrocooccus caseolyticus</i>	Espèce	2,163

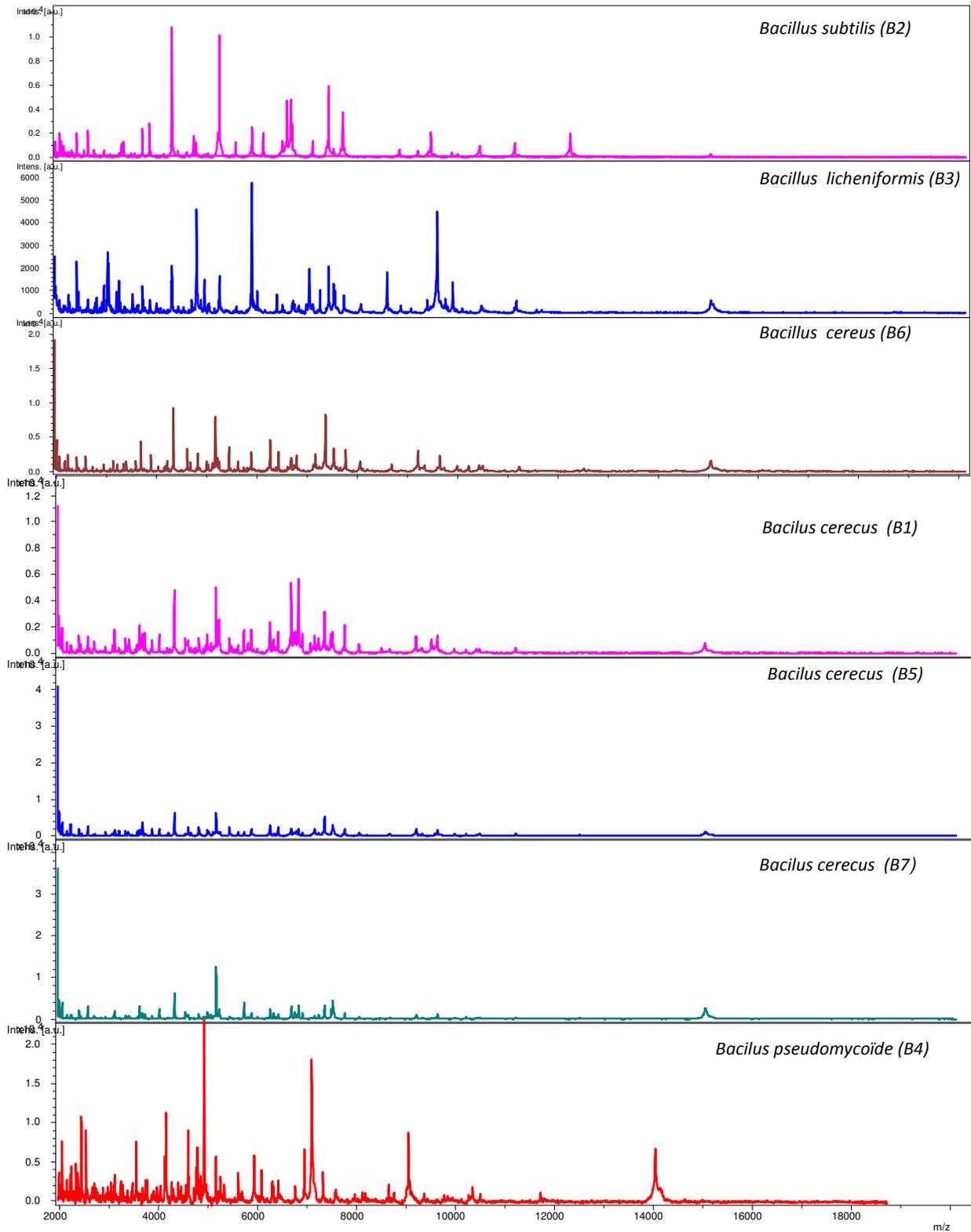


Figure 14 : Caractéristiques des profils protéiques des douze isolats révélés par MALDI-TOF MS*.

*les pics représentent l'intensité ou l'abondance relative des ions.

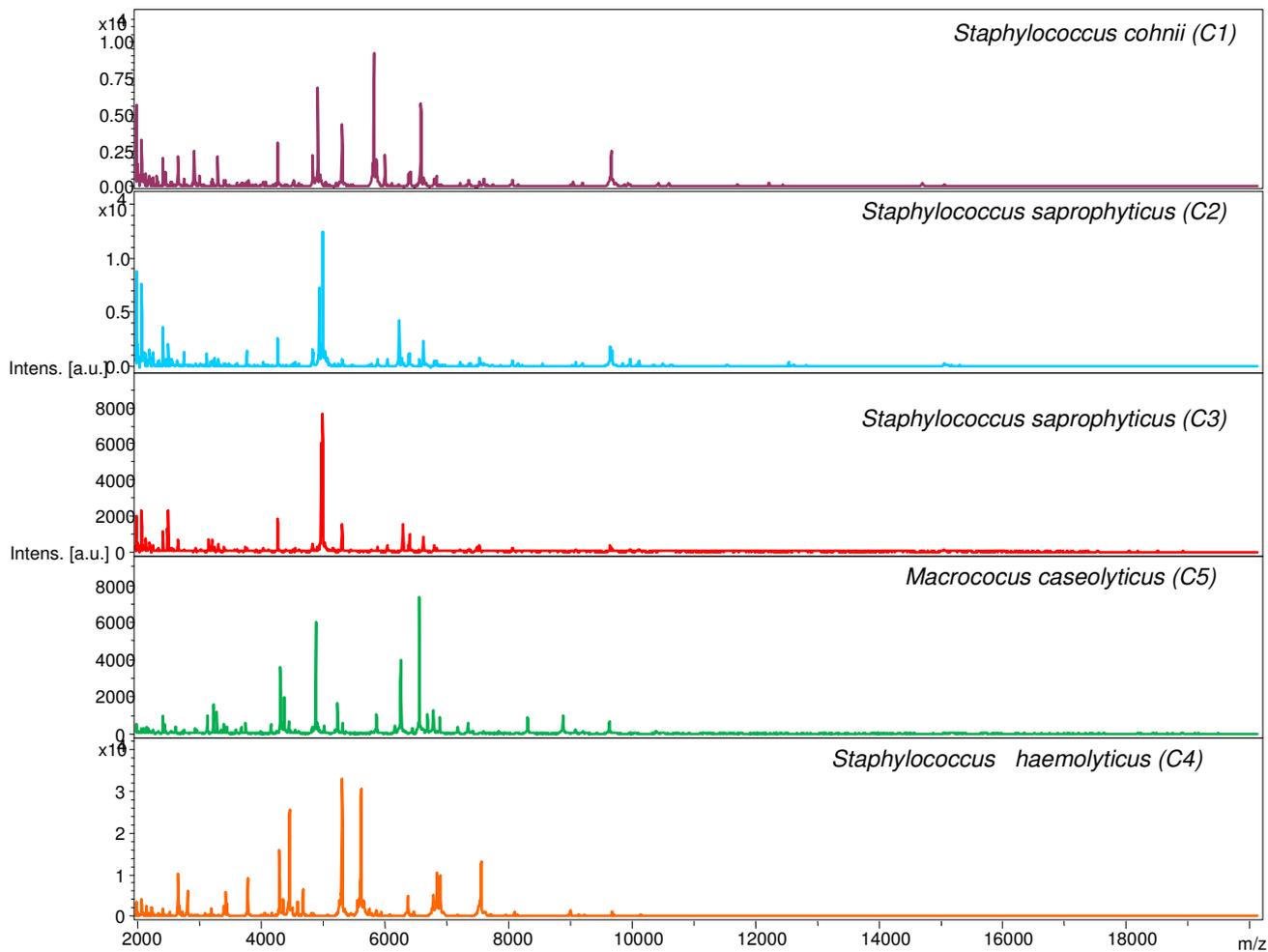


Figure14 : Caractéristiques des profils protéiques des douze isolats révélés par MALDI-TOF MS (Suite).

Les listes des pics dérivés à partir des spectres peuvent être utilisées aussi bien pour l'identification, que pour la génération d'un dendrogramme de classification. Le score obtenu dans ce contexte est utilisable pour la production de dendrogrammes et l'analyse de la relation de parenté des individus (Figure 15). Cette approche permet une véritable comparaison entre les profils protéiques des bactéries isolées.

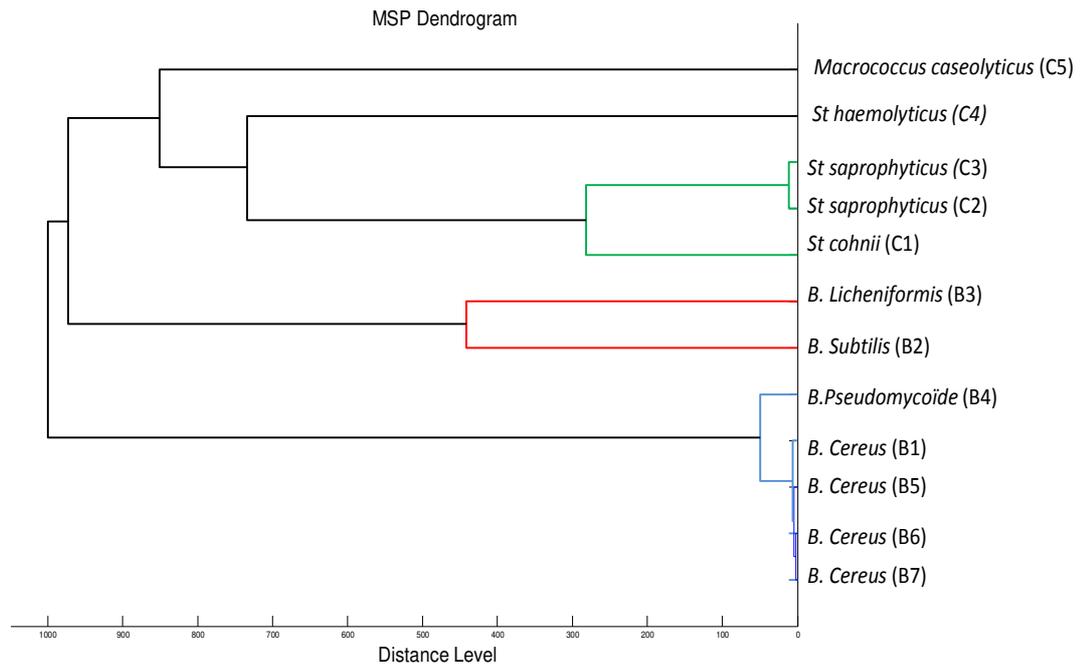


Figure 15: Dendrogramme des isolats bactériens (avec redondance) réalisé avec le logiciel MALDI BioTyper TM 3.0.

1.3. Identification génotypique (Séquençage du gène de l'ADNr 16S)

Les résultats de l'identification génotypique par séquençage du gène de l'ADNr 16S ont concerné cinq isolats parmi douze, car sept isolats ont donné des électrophorèses insuffisantes suites à leurs PCR respectives. Les résultats de PCR pour ces sept isolats sont jugés insuffisants pour le séquençage du gène *ADNr16S*. Les cinq isolats restant sont représentés sur le tableau 12. Les séquences obtenues sont comparées avec celles de la banque de données "Nucleotide" en utilisant l'outil bioinformatique BlastN. Une bonne identification est conséquente d'un pourcentage d'identité supérieur ou égal à 97% entre la séquence requête et celle de Nucleotide (Stackebrandt et Goebel, 1994).

Les séquences du gène de l'ADNr 16S obtenues pour les cinq isolats sont enregistrées dans la banque de données GenBanK sous les numéros d'accession mentionnés dans le tableau 13. Les résultats de l'alignement multiple de ces séquences est présenté en (Annexe E).

Tableau 12: Résultats du BLAST N des séquences du gène *ADNr16S* de cinq isolats

Isolat	Nom proposé par BLAST	% Couverture	E-value	% identité	N° accession
B1	<i>Bacillus cereus</i>	100	0,0	100	CP023179.1
	<i>Bacillus anthracis</i>	100	0,0	100	CP023001.1
B2	<i>Bacillus subtilis</i>	100	0,0	99,93	MK124647.1
B3	<i>Bacillus licheniformis</i>	99	0,0	99,85	KY497446.1
	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	99	0,0	99,70	CP023666.1
C1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	100	0,0	100	MH665982.1
C2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99	0,0	99,95	NR079994. 2

bactériens.

Tableau 13 : Codes GenBank des séquences d'ADNr 16S pour les 5 isolats bactériens.

Isolat	Numéro d'accension	Nom d'espèce
B1	MH715020	<i>Bacillus cereus</i>
B2	MH715021	<i>Bacillus subtilis</i>
B3	MH715022	<i>Bacillus licheniformis</i>
S1	MH715023	<i>Staphylococcus cohnii</i>
S2	MH715024	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>

Pour l'analyse du gène de l'ADNr 16S, l'ensemble des isolats a été identifié via le Blast en proposant une seule espèce avec des valeurs de scores et de E-value significatives, sauf pour :

- L'isolat B1: Dont la séquence est à 100 % identique avec celle de *Bacillus anthracis* (NCBI N° Accession. CP023001.1) et de *Bacillus cereus* (NCBI N° Accession. CP023179.1).
- L'isolat B3 : Dont la séquence est à 99,70% identique avec celle de *Bacillus paralicheniformis* (NCBI. N° Accession CP023666.1) et à 99,85% avec celle de *Bacillus licheniformis* (NCBI. N° Accession KY497446.1).

Les liens phylogénétiques (Figure 16) entre les séquences des cinq isolats bactériens, basés sur les gènes de leur ADNr 16S sont évalués en utilisant le programme phy ML3.

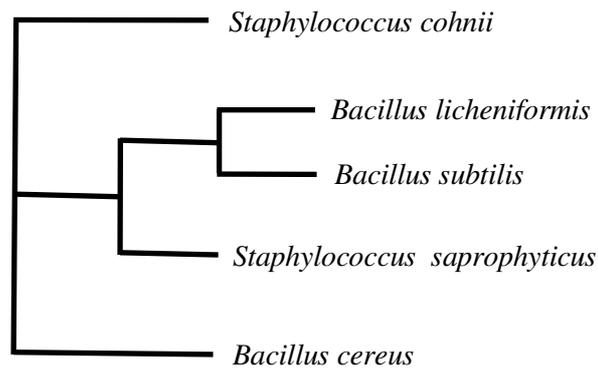


Figure 16 : Arbre phylogénétique construit avec la méthode du maximum de vraisemblance montrant les liens phylogénétiques entre les séquences des gènes de l'ADNr 16S de 5 isolats bactériens.

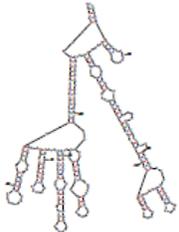
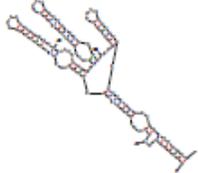
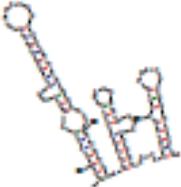
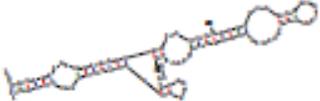
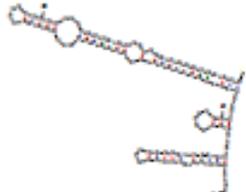
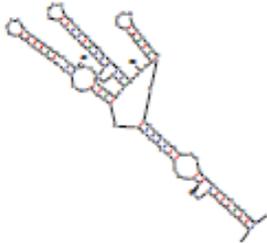
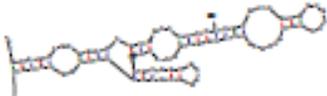
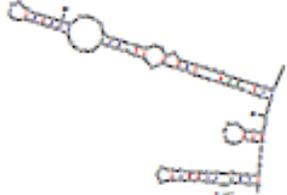
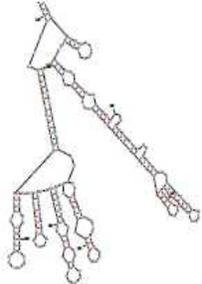
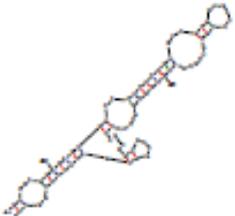
1.4. Prédiction de la structure 2D du gène de l'ADNr 16S

L'étude des communautés microbiennes, ou microbiotes, sur la base des ARNr, connaît un essor remarquable depuis les années 1980 (Dauga, 2005) du fait que leur implication directe dans la mécanique de la synthèse des protéines limite leur dérive évolutive et rend difficile voire impossible leur transfert horizontal. Ils constituent donc un identifiant stable et fiable des organismes procaryotes et eucaryotes. C'est même autour de cette stabilité génétique que s'est ancrée la notion d'espèce chez les bactéries ainsi que la classification phylogénétique (Romby, 2009).

Les résultats de la prédiction 2D des séquences d'ARNr 16S pour les trois souches *B. subtilis*, *B. cereus* et *B. licheniformis* (Figures des trois ARNr 16S) (Annexe G et H) ont révélé des zones de forte similarité présentant des motifs structuraux similaires voire identiques, synonymes d'une possible homologie entre ces individus.

En effet, en considérant la structure 2D de l'ARNr 16S de *B. subtilis* (1502 pb) comme repère (patron) pour la comparaison visuelle des structures 2D, il ressort que celui-ci partage avec *B. cereus* quatre motifs (B, C, D et E) formés sur le pourtour d'une grande boucle multiple centrale ; alors qu'il ne partage avec *B. licheniformis* que les motifs A et D. Les deux isolats *B. cereus* et *B. licheniformis* ont en commun le seul motif D. Ce dernier, étant la seule structure (motif) commune chez les trois isolats (Tableau 14). Le motif E est une suite de trois tiges consécutives : e1, e2 et e3. La tige e1 est caractérisée par la présence d'un bulge (renflement), alors que la tige e3, en plus d'un bulge, elle comporte deux boucles internes. Le motif D, quant à lui est constitué de trois boucles internes et une terminale.

Tableau 14 : Motifs 2D Structuraux des trois isolats *Bacillus*.

Isolats	Motifs structuraux 2D				
	A	B	C	D	E
<i>B. subtilis</i>					
<i>B. cereus</i>					
<i>B. licheniformis</i>					

Du point de vue énergétique, la prédiction des structures 2D des ARNr 16S a donné des repliements (foldings) stables avec des énergies libres importantes (Tableau 15). Nous constatons, que la structure prédite 2D de *B. subtilis* présente l'énergie d'empilement la plus basse (-513,8 Kcal/mol.).

Tableau 15 : Énergies libres après folding

Isolats	Taille (pb)	Energie libre (Kcal/mol.)
<i>B. subtilis</i>	1502	- 513,8
<i>B. cereus</i>	1450	-468,0
<i>B. licheniformis</i>	1327	-433,8

La prédiction de la structure 2D de *S. cohnii* et *S. saprophyticus* a révélé des structures 2' (Figures 2D 16S) (Annexe G) avec beaucoup de divergences comparativement aux trois espèces de *Bacillus*. Une boucle multiple centrale plus importante chez *S. cohnii* à partir de laquelle partent plusieurs motifs sous forme de tiges, alors que la boucle multiple de *S. saprophyticus* est plus réduite, avec seulement huit tiges qui en divergent. Ce résultat exprime une plus nette divergence structurale des ARNr 16S de ces deux espèces.

L'énergie libre des deux structures est respectivement -210,2Kcal/mol. et -175,0 Kcal/mol. pour *S. cohnii* et *S. saprophyticus*.

2. DISCUSSION

Les bactéries jouent un rôle important dans l'industrie alimentaire. Elles sont utilisées comme cultures de départ pour la fabrication de fromages, de yaourts ou d'autres aliments fermentés, mais elles sont également responsables de la détérioration des aliments et des intoxications alimentaires. L'identification et la différenciation des bactéries liées à l'alimentation sont indispensables à l'assurance qualité et constituent la base de la sécurité alimentaire (Wenning *et al.*, 2014).

2.1. Analyse microbiologique

Dans ce travail, l'évaluation de la qualité hygiénique des échantillons de lait étudiés en comparaison avec les limites de conformité indiquées dans les normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les laits et produits laitiers dérivés de la réglementation Algérienne (JORADP N°35, 1998) ont permis de qualifier cette dernière comme une qualité satisfaisante.

2.1.1. Matières premières (Poudre de lait et eau de reconstitution)

-Poudre de lait (0% et 26%)

Les valeurs du dénombrement de la flore aérobie mésophile (germes témoins de rupture de la chaîne de froid), se sont avérés conformes aux normes en vigueur; ceci peut s'expliquer par les bonnes conditions d'emballage et l'absence d'altération durant le stockage de la poudre. En effet, la croissance des microorganismes dépend de l'activité de l'eau du produit (poudre) (Cheftel *et al.*, 1984) plus le taux d'humidité de la poudre de lait est supérieur, plus les germes aérobies mésophiles sont élevés. Broutin *et al.* (2005), montrent que la poudre de lait importée est souvent jugée de bonne qualité sanitaire à condition qu'elle présente une activité de l'eau empêchant la multiplication des microorganismes, et si l'action bactéricide des procédés utilisés pour leur fabrication (séchage) est fiable, une recontamination due aux germes tels que les salmonelles, les staphylocoques, *E.coli*, levures et moisissures, peut survenir par la suite, notamment lors de l'humidification pendant le stockage, sur le lieu de vente ou lors des manipulations. De plus, nous avons constaté l'absence totale de coliformes et de *Clostridium* sulfite-réducteurs dans tous les échantillons testés. Ceci témoigne que la poudre de lait provient d'animaux sains, et que la pasteurisation et la technologie de séchage subi par cette dernière a été réalisée en respectant les normes réglementaires en matière d'hygiène et de salubrité.

-Eau de reconstitution (process)

L'eau est le constituant majeur en pourcentage des produits laitiers reconstitués. Broutin *et al.* (2005) expliquent que cette eau est une source potentielle de contamination par les germes. Il s'avère donc impératif de pasteuriser le lait reconstitué afin de détruire ou réduire les germes pathogènes et d'altérations présents dans le lait et dans l'eau. De plus, selon Bouziani. (2006) si l'eau n'est pas potable de façon permanente, il est indispensable de la traiter, notamment par la pasteurisation ou la chloration. Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les échantillons d'eau utilisées dans la reconstitution du lait ont montré que ces derniers sont conformes aux normes concernant le nombre de germes aérobies mésophiles à 22 et 37 °C ainsi que l'absence de germes pathogènes. Donc, connaissant la source de l'eau de reconstitution (eau de distribution), en plus des traitements au charbon actif et la chloration appliqués par la laiterie, nous pouvons attester l'efficacité de ces derniers et du nettoyage et de désinfection de la tuyauterie de l'usine qui transporte l'eau.

2.1.2. Lait reconstitué avant / après pasteurisation et produit fini

Afin de confirmer l'efficacité du traitement de pasteurisation sur la réduction des microorganismes initialement présents, des dénombrements sont effectués en amont (le lait reconstitué) et en aval (le lait pasteurisé) du traitement. Selon les résultats obtenus on constate une réduction considérable et drastique de la totalité des germes initialement dénombrés. Ainsi, on note l'élimination de la flore aérobie mésophile et des germes pathogènes (espèces de staphylocoques), chose prévisible parce que ces bactéries sont sensibles à un traitement thermique de type pasteurisation (Guiraud, 1980). Cette réduction presque totale résulte de l'action complémentaire de deux paramètres à savoir un traitement de pasteurisation efficace et des matières premières et intermédiaires de bonne qualité. Ces résultats permettent de confirmer donc l'efficacité du traitement de pasteurisation effectuée au sein de la laiterie, qui a pour but de réduire la microflore originelle du lait reconstitué et de la ramener à un seuil acceptable. Cependant, en ce qui concerne le produit fini on note une augmentation du nombre de la flore aérobie mésophile tout en restant dans les normes et ceci pour tous les échantillons.

2.2. Identification des isolats bactériens

L'échantillonnage effectué tout le long des différentes étapes de la chaîne de production des échantillons de lait pasteurisé a permis de détecter une contamination par les espèces de staphylocoques à coagulase négative (Annexe F). Les techniques génomique et protéomique utilisées dans cette étude ont permis d'identifier les espèces suivantes : *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*. La présence de ces espèces est probablement due à un environnement contaminé ou à des pratiques de fabrication non hygiéniques (fabrication dans un environnement non satisfaisant, le long de la chaîne de production, manutentions non hygiéniques etc.). Les mêmes résultats montrant la présence de ces espèces dans le lait et d'autres produits laitiers ont été rapporté par de nombreux auteurs (De Luca *et al.*, 1997 ; Delbe`s et Montel., 2005 ; Enquebahe Tarekne *et al.*, 2015). Une seule espèce appartenant au genre *Macrocooccus* a été également identifiée, il s'agit de *Macrocooccus caseolyticus*. Parmi les différents genres de bactéries, *Macrocooccus* est le plus étroitement apparenté au genre *Staphylococcus*. Historiquement, il avait été inclus dans la famille des staphylocoques jusqu'à ce qu'il soit réaffecté à un genre indépendant en raison de sa spécificité (taille de son génome plus petite que celle des staphylocoques) (Kloos W. E. *et al.*, 1998). Actuellement, le genre *Macrocooccus* comprend sept espèces : *Macrocooccus bovicus*, *M. carouselicus*, *M. caseolyticus*, *M. equipercicus*, *M. brunensis*, *M. hajekii* et *M. lamae* (Mannerova S. *et al.*, 2003). Contrairement aux espèces staphylocoques, les macrocoques ne causent pas de maladies humaines ou animales et sont généralement isolés de la peau des animaux et des aliments tels que le lait et la viande. Les caractéristiques physiologiques de cet organisme sont, cependant, en grande partie inconnue, et seul un petit nombre de rapports sur les macrocoques ont été publiés (Baba *et al.*, 2009). *M. caseolyticus*, précédemment classé en tant que *Staphylococcus caseolyticus* (Schleifer K. H. *et al.*, 1982), aurait été isolé de lait de vache, d'organes de bovins et des usines de transformation des aliments (Baba *et al.*, 2009).

Parallèlement, et en se basant sur la définition de la flore aérobie mésophile, regroupant aussi bien des microorganismes pathogènes que d'altération, nous nous sommes intéressé à identifier les isolats ayant poussé sur le milieu PCA, utilisé pour le dénombrement de cette flore, afin de pouvoir détecter la présence des germes d'altération ou des pathogènes.

Dans cette étude, sept isolats appartenant au genre *Bacillus* sont identifiées par les techniques moléculaires (Annexe F). La détection de la contamination par des espèces

du genre *Bacillus*, au niveau des échantillons de laits peut probablement s'expliquer par leur caractère ubiquitaire et leur large distribution dans l'environnement, comme rapporté par Bartoszewicza *et al.* (2008) facilitant ainsi leur contamination dans une variété d'aliments à différents stades de la chaîne alimentaire (Oguntoyinbo, 2007). La contamination peut être transmise par divers substrats, y compris le sol, les céréales et les équipements laitiers (Bartoszewicza *et al.*, 2008). De nombreuses études ont signalé que les espèces *Bacillus cereus spp* sont des contaminants courants retrouvées dans une grande variété d'aliments, y compris le lait et d'autres produits laitiers (Becker *et al.*, 1994 ; Reyes *et al.*, 2007 ; Bartoszewicza *et al.*, 2008). De manière remarquable, ces espèces sont capables de survivre à la pasteurisation et de produire des endospores dans les aliments crus et traités thermiquement (Durak *et al.*, 2006). De plus, ces bactéries sont connues par leur potentiel de formation de biofilms, car il a été démontré que ces bacilles ont un grand pouvoir d'adhésion et de formation de biofilms au niveau des installations en acier inoxydable et sont de ce fait très difficiles à éradiquer (Flint *et al.*, 1991 ; Faille C. *et al.*, 2014).

En particulier, la contamination du lait par des membres du groupe *Bacillus cereus* est importante, non seulement en raison de leur capacité d'altération, mais aussi en raison de leur potentiel à provoquer des maladies humaines (Andersen Borge *et al.*, 2001; Janstova *et al.*, 2006). En effet, il a été reconnu que *B. cereus* est un agent causal d'intoxications alimentaires depuis plus de 40 ans et a été associé à des syndromes émétiques et diarrhéiques d'origine alimentaire (Ghelardi *et al.*, 2002). *B. licheniformis* a été associé à divers syndromes cliniques et incidents d'intoxication alimentaire chez l'homme, à la toxémie bovine et aux avortements (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999), et à des incidents d'altération alimentaire tels que le pain effiloché (Sorokulova *et al.*, 2003). *B. subtilis* n'est généralement pas considéré comme un pathogène humain, mais il peut occasionnellement contaminer les aliments et provoquer une intoxication alimentaire (Fernandez *et al.*, 2013). L'aptitude à la détérioration de ces bactéries sporulées est caractérisée par leur capacité à produire deux types d'enzymes extracellulaires importantes responsables de la dégradation du lait. Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (De Jonghe *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montrés que les bactéries aérobies sporulées appartenant au groupe *Bacillus cereus* ont été liées de façon répétée à la détérioration du lait cru et reconstitué pasteurisé ainsi que d'autres produits laitiers (Cempirkova R., 2002 ; Cosentino S. *et al.*, 1997 ; Crielly E.M. *et al.*, 1994 ; Ternstro A. *et al.*, 1993 ; Meer R.R *et al.*, 1991).

A la lumière de ces résultats, il est à constater que les critères bactériologiques utilisés dans cette étude, nous ont fourni une bonne orientation (mais pas suffisante) par rapport à l'acceptabilité des produits analysés et de leurs procédés de fabrication, de manutention et de distribution. Nous ne pouvons conclure, à ce stade d'analyse de la fiabilité absolue de ces critères et de leurs résultats à faire partie des procédures HACCP du fait que des lacunes saillantes pourraient se trouver dans ces procédures classiques de contrôle telles que : la représentativité statistique des échantillons analysés et les bonnes pratiques d'hygiène le long de toute la chaîne de transformation (BA A., 2008).

A ce stade de l'étude, les résultats obtenus montrent que les facteurs (paramètres) ayant un impact sur le risque de la contamination par des espèces appartenant aux genres *Bacillus* et *Staphylococcus* confirment l'utilité des mesures de maîtrise appliquées en industrie agro-alimentaire. Les causes des dangers bactériens identifiés (*Bacillus* et *Staphylococcus*) sont décelées par la méthode des 5M (Annexe J). Ainsi, les outils HSE (Hygiène Sécurité et Environnement) peuvent contribuer à la diminution du contact direct entre le produit et le personnel affilié à la chaîne de production, ces derniers peuvent se traduire dans la réalité industrielle par le port des gants sinon par le lavage des mains ou l'utilisation des gels nettoyants et désinfectants avant toute manipulation des poudres, de plus il faut interdire au personnel malade de manipuler ce produit. Un des paramètres le plus incriminé dans la contamination par ces mêmes germes est l'environnement, son niveau de contamination n'est pas observable directement mais peut être estimé grâce aux résultats des plans de contrôle. Ainsi, l'intégration des analyses microbiologiques de l'environnement au plan de contrôle, représente un outil supplémentaire pour la gestion du risque encouru par les consommateurs (*Codex alimentarius*, 2009).

La détection de la contamination par des bactéries du genre *Bacillus* au niveau de la plupart des sites de prélèvement et surtout au niveau du produit fini (Annexe F), nécessite des investigations plus poussées, notamment la qualité des poudres de lait (matière première) qui doit être satisfaisante sur le plan microbiologique (*Codex alimentarius*, 2009), assurant ainsi une bonne qualité du produit fini. Ceci peut être assuré par une meilleure conservation des poudres (endroit sec) pour éviter la germination des formes sporales (germes thermorésistants ayant échappé au traitement de séchage subit par ses poudres) et par l'obligation de les soumettre aux analyses microbiologiques; la qualité et la fréquence des opérations d'hygiène et de nettoyage des installations et de la tuyauterie. Si celles-ci ne sont pas exécutées

conformément il pourrait en résulter un assainissement inadéquat ou insuffisant susceptible d'augmenter le risque de la contamination du lait pasteurisé par des bactéries capables de former des biofilms à l'exemple des espèces de *Bacillus*.

En outre, les résultats de cette étude permettent de prêter une attention particulière à la pasteurisation en tant qu'étape clé ou point critique à surveiller en continu pour maîtriser le risque de la contamination du produit fini. Pour cela un entretien palliatif du pasteurisateur et une surveillance rigoureuse et continue de l'application du couple temps/température est nécessaire pour un résultat efficace.

A terme, les résultats de cette étude montrent que dans un contexte de mesures d'hygiène et de contrôle correctement appliqués tout le long de la chaîne de fabrication, les risques de contamination des matières premières, des produits intermédiaires et du produit fini sont quasiment nuls et que seule une défaillance importante en termes d'hygiène peut engendrer une augmentation de ce risque. Pour cela, l'unité de production doit déployer des efforts considérables portant sur les différents points que nous avons évoqué pour acquérir les bonnes pratiques d'hygiène nécessaires à une application ultérieure et efficace du système HACCP.

2.2.1 Caractérisation phénotypique et biochimique des isolats : L'arbre phylogénétique généré, suite aux résultats de l'identification phénotypique et biochimique, montre deux classes distinctes : la classe des cocci et la classe des bacilles.

-A une distance de 25% la classe des cocci quant à elle est partagée en deux groupes. Un groupe formé par les individus C2, C3, C4 et C1 et un deuxième groupe formé par un seul individu C 5. Les individus C2 et C3 sont les plus similaires dans cette classe il s'avère que C2 et C3 est l'espèce *St. Saprophyticus*, identifiée par MALDI TOF avec un bon score.

-A la distance de 5% la deuxième classe (bacilles) est partagée à 11,7%. Elle comprend deux groupes distincts formés par les individus B6, B7, B1 et B5 et par B2, B3 et B4. Au sein de ce groupe les individus B2 et B3 sont fortement similaires il s'agit des espèces *B. subtilis* et *B. licheniformis* respectivement tous deux identifiées par MALDI TOF avec un score > à 2.

2.2.2. Analyse protéomique : Deux isolats (B1 et B3) sont identifiés comme *B. cereus* et *B. licheniformis* par MALDI-TOF. Cependant, le séquençage du gène de l'ADNr 16S a identifié l'isolat B1 comme étant *B. anthracis* avec 100% d'identité avec le code NCBI (CP023001.1) et *B. cereus* avec 100% d'identité avec le numéro d'accèsion (CP023179.1). Cet isolat ne pouvait pas être différencié par cette analyse. Ce résultat est observé dans l'étude de Helgason *et al.* (2000) dans lequel ils indiquent que *B. anthracis* est génétiquement très proche de certaines souches de *B. cereus* et de *B. thuringiensis*. Ces mêmes observations concernent aussi l'isolat B3 dont le BLAST n'a pas fourni une distinction nette entre *B. licheniformis* et *B. paralicheniformis* en raison de la forte homologie de leurs séquences respectives.

Il est à noter que ces deux isolats (B1 et B3) ont été présomptivement identifiés comme *B. cereus* et *B. licheniformis*, respectivement sur la base de leurs caractéristiques morphologiques présentées par leurs colonies sur le milieu gélose au sang de mouton (Columbia Sheep Blood Agar), la coloration de Gram et l'étude de certaines de leurs caractéristiques biochimiques (Tableau 10). En effet, l'espèce *Bacillus cereus* appartient au groupe *Bacillus cereus*, appelé également *Bacillus cereus sensus lato*, constitué d'espèces relativement très proches il s'agit de : *Bacillus cereus sensus stricto* bactérie pathogène opportuniste de l'homme, *Bacillus thuringiensis* pathogène d'insectes, *Bacillus anthracis* agent de l'anthrax ou maladie du charbon, *Bacillus mycoide* et *pseudomycoide* les deux caractérisées par une croissance rhizoïde sur milieux solides et enfin une espèce psychrotolérante *Bacillus weihenstephanensis* (Jensen, 2003). Pour différencier *Bacillus cereus* des autres espèces proches (*Bacillus anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus thuringiensis*) certains caractères culturels, physiologiques et biochimiques peuvent être pris en considération. *Bacillus anthracis* peut être différenciée par son caractère immobile, *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides* sont caractérisées par leurs colonies rhizoïdes typiques sur milieux gélosés, *Bacillus thuringiensis* est une espèce présentant des cristaux, *Bacillus weihenstephanensis* est la seule espèce de ce groupe capable de croître à 7° C. En prenant en compte toutes ces différences l'isolat B1 est probablement l'espèce *Bacillus cereus sensus stricto* communément connue sous le nom de *Bacillus cereus*. Il a été rapporté par la bibliographie que *B. licheniformis* possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus sensu stricto* cependant certains caractères incluant la mobilité l'utilisation du mannitol et l'activité hémolytique permettent de les différencier (Jensen., 2014).

Nos résultats confirment des études antérieures signalant des difficultés dans l'identification de certaines espèces de *Bacillus*; en raison des similitudes dans leurs séquences d'ADNr 16S (Fernández *et al.*, 2013). La technique MALDI-TOF MS a identifié ces isolats avec des scores élevés de 2,18 et 2,17 respectivement pour B1 et B3 montrant sa capacité à différencier les espèces de ce groupe. De plus, à partir des données des pics obtenus, il est également clair que MALDI-TOF MS fournit des profils protéiques caractéristiques qui permettent l'identification de différentes espèces appartenant au même genre bactérien. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés dans les études réalisées par Dos santos *et al.* (2010) et par Fernandez *et al.* (2013). Les résultats de cette étude confirment l'exactitude de l'approche des empreintes moléculaires MALDI-TOF MS dans l'identification des espèces de *Bacillus* isolées à partir de lait pasteurisé.

L'approche protéomique MALDI-TOF MS est de plus en plus proposée comme outil d'identification rapide. Shin *et al.* (2015) voient dans cette technique un candidat fort pour substituer les analyses ADN 16S afin d'identifier les isolats à l'échelle de l'espèce et permettre ainsi une plus rapide prise en charge des patients infectés par *Aeromonas sp.* De leur part, La Scola *et al.* (2011) concluent que l'identification basée sur MALDI-TOF MS, deviendra plus efficace avec l'amélioration des bases de données des spectres, et sera probablement responsable du fardeau de l'identification des germes anaérobies émergents en microbiologie clinique. Veloo *et al.* (2018) affirment dans leur étude que le projet ENRIA (European Network for the Rapid Identification of Anaerobes : groupe pour l'exigence qualité) a réussi à augmenter le nombre d'isolats anaérobies pouvant être identifiés par MALDI-TOF MS avec une grande confiance. Par conséquent, ils recommandent d'élargir davantage la base de données des profils afin d'inclure des espèces moins fréquemment isolées, ce qui leur permettrait également de mieux comprendre la pertinence clinique de ces bactéries anaérobies moins courantes. Pour Bohme *et al.* (2013), MALDI-TOF MS est un outil d'identification bactérienne compétent qui peut améliorer les approches phénotypiques et génotypiques, permettant ainsi une classification plus complète des souches bactériennes.

2.2.3. Analyse du gène *ADNr 16S*

Le séquençage de ce gène est la méthode de référence pour l'identification des espèces bactériennes utilisées dans la présente étude. Cette méthode génomique est considérée comme la technique la plus largement acceptée pour l'identification bactérienne (Song *et al.*, 2003). Cependant, comme pour toute méthode d'identification, il existe des limites pour le séquençage du gène de l'ADNr 16S (Janda et Abbott, 2007). Comparée à la méthode MALDI-

TOF MS, elle est moins efficace pour l'identification, limitée par la forte homologie des séquences d'espèces. Le gène *ADNr 16S* reste nécessaire mais pas suffisant pour confirmer l'appartenance à l'espèce du point de vue systématique car de nombreux auteurs et chercheurs préconisent l'utilisation simultanée de ce gène avec des gènes de référence (House Keeping genes) pour une meilleure et plus précise identification des isolats à l'échelle de l'espèce. En effet, selon Christensen *et al.* (2004), le gène *ADNr 16S* ne peut à lui seul permettre de tracer une phylogénie entre les membres d'une même famille (*Pasteurellaceae*) sans l'ajouter aux gènes de ménage tels que *atpD*, *infB* et *rpoB*. Ils notent que même si la comparaison des séquences d'ARNr 16S a été l'outil le plus bénéfique à ce jour pour améliorer la classification des membres des *Pasteurellaceae* et même si 95 espèces ou espèces similaires ont été caractérisées par analyse de la séquence du gène 16S de l'ARNr, ils rapportent l'insuffisance de cet outil et estiment que l'existence de taxons non nommés est principalement due à la désignation insuffisante des souches types et à l'absence de caractères pour les séparer des espèces nommées existantes ainsi que le nombre limité de souches disponibles pour certains taxons et le manque de résultats d'hybridation ADN-ADN, ce qui permettrait de valider des génotypes distincts en tant que nouveaux candidats pour les espèces. L'analyse des gènes dits de ménage a été suggérée dans leur étude pour éviter le problème d'insuffisance ADNr 16S à distinguer certains membres bactériens, et l'addition de ces gènes leur a permis de tracer une inférence phylogénétique. De plus, si les gènes informationnels ont une ramification plus profonde au niveau taxonomique du domaine, comparés aux gènes opérationnels (codant les enzymes des métabolismes), les gènes informationnels et opérationnels, (appelés tous deux gènes de ménage), ont été sélectionnés pour l'évaluation de la cohérence de la phylogénie à base de gènes d'ARNr 16S dans leur enquête.

Pascual *et al.* (2010), ont rapporté la nécessité d'utiliser les gènes de ménage *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* et *toxR* en plus du gène *ADNr 16S* pour mieux distinguer entre les isolats du genre *Vibrio* (*Vibrio* Core Group) à l'échelle de l'espèce sans pour autant avoir recours à l'hybridation ADN/ADN. Ils ajoutent que la méthode MLSA (MultiLocus Sequence Analysis) est devenue une méthode alternative en bactériologie et est en cours d'évaluation suite aux recommandations du comité *ad hoc* pour la ré-évaluation de la définition de l'espèce en bactériologie.

A leur tour, Shin *et al.* (2015), en travaillant sur le genre *Aeromonas*, un pathogène agent causal de gastroentérites et de septicémies, indiquent qu'il est difficile de distinguer les isolats de ce genre au niveau de l'espèce, surtout pour les urgences cliniques où la guérison se voit attardée pour les patients. Selon leur conclusion, l'association *ADNr 16S* et les deux gènes de ménages *gyrB* et *rpoB* reste la meilleure solution pour une identification des espèces du genre *Aeromonas*.

2.2.4. Prédiction de la structure 2D du gène de l'ADNr16S

Les modèles de structure 2D prédits pour l'ARNr 16S basés sur les données de séquences (alignement multiple), montrent un bon accord entre les contraintes dictées par le modèle de prédiction et une grande variété d'observations expérimentales (structures 2D).

Les différences observées au niveau des structures 2D des ADNr 16S des souches, s'expliqueraient par le fait que, contrairement au gène ribosomique 5S, les gènes 16S ribosomiques semblent manquer de robustesse mutationnelle car ils forment le noyau structurel du ribosome (Kitahara, 2012) ; celui-ci étant tolérant à l'échange interspécifique à cause de la flexibilité des interactions entre ses partenaires. Pour confirmer la différence des structures 2D entre les différentes espèces, Visotzkey *et al.* (1992) ont comparé des structures secondaires de trois espèces de *Bacillus* : *B. subtilis*, *B. cycloheptanicus* et *B. acidoterrestris* et ont rapporté des différences de structures dans les diagrammes des hélices (tiges avec boucle terminale) chez ces trois espèces.

Pour Fox *et al.* (1992), les séquences du gène *ARNr 16S* de trois espèces psychrophiles (*B. glaxisporis*, *B. psychrophilus* W16A^T et *B. psychrophilus* W5) ont exprimé 99,5% d'identité en les alignant. En revanche, l'hybridation ADN-ADN a révélé de manière convaincante que ses individus n'appartenaient pas à la même espèce. Ces résultats soulignent un point important, que l'identité effective des séquences ARNr 16S n'est pas nécessairement un critère suffisant pour garantir l'identification à l'échelle de l'espèce. Ainsi, bien que les séquences ARNr 16S puissent être utilisées régulièrement (par routine) pour distinguer et établir des relations entre les espèces d'un même genre bien résolu, des espèces très divergentes ne peuvent être reconnues.

Selon Wang *et al.* (2007), le groupe *B. subtilis* comprend huit individus étroitement apparentés qui ne peuvent être distingués les uns des autres par la simple analyse des séquences (alignements) géniques 16S. Cependant, le gène *gyrB* (sous-unité B de la DNA gyrase) fait office de marqueur phylogénétique. Les similarités des séquences nucléotidiques de *gyrB* et leurs séquences traduites en acides aminés parmi les huit individus analysés étaient de 75,4-95% et 88,5-99,2% respectivement, tandis que les séquences ARNr 16S ont montré une similarité de 98,1-99,8%. Selon ces résultats, les séquences *gyrB* fournissent une résolution meilleure que celle des séquences ARNr 16S. De plus, ces résultats étaient en accord avec ceux de l'hybridation ADN-ADN, car une corrélation a été observée entre la similarité des séquences *gyrB* et la parenté ADN-ADN. En fin, dans leur conclusion, ils montrent que les séquences ARNr 16S sont extrêmement limitantes pour une discrimination des espèces du groupe *B. subtilis*.

Dolzani *et al.* (1994) proposent l'amplification intergéniques 16S-23S ARNr pour mieux différencier les espèces de *S. aureus*. Ils ajoutent que leur méthode apporte une bonne discrimination entre les 74 isolats staphylococciques analysés en utilisant ces régions plutôt que le gène *ARNr 16S* seul. A leur tour, Coenyé et Vandamme (2003), confirment cette même thèse en concluant que l'hétérogénéité intragénomique entre les opérons d'ARNr 16S est plutôt limitée et qu'il est peu probable qu'elle ait un effet profond sur la classification des taxons. Ils précisent également que les transitions et les transversions étaient observées dans les régions variables V1, V2 et V6.

En analysant la structure secondaire des ARNr 5S et leur phylogénie, Dekio *et al.* (1984) ont montré une meilleure similarité de ces structures chez *S. aureus* et *S. epidermidis* contrairement aux espèces de *Micrococcus*.

Les divergences structurales 2D observées entre les trois isolats de *Bacillus* d'une part, et entre les deux *Staphylococcus* d'autre part, indiquent bien la fiabilité de l'outil 16S à distinguer entre ces espèces. La structure 2' ferait donc office d'une signature moléculaire spécifique au sein des différentes communautés bactériennes et il n'y aura aucun souci à les distinguer par leurs seuls repliements 2D. A ce propos, il est nécessaire de procéder à la création d'une base de données de structures secondaires pour faciliter la comparaison des structures 2' et pouvoir apporter un élément plus précis à l'identification des isolats.

L'outil 16S est une étape nécessaire pour distinguer les isolats bactériens mais reste largement insuffisant pour la confirmation au stade de l'espèce. Les analyses bioinformatiques des structures 2D de ce gène apportent plus d'informations par rapport aux simples alignements multiples pour la réalisation des phylogénies.

En effet, des méthodes d'analyse des structures 2D des ARNr 16S ont permis d'apporter plus de détails structuraux. Ces méthodes s'appuient sur des algorithmes de comparaison des structures 2D ARNr 16S lorsqu'elles sont converties sous forme d'arbres enracinés ou sous forme de parenthèses (Annexe I).

En fin, les comparaisons de structures 2' corroborent les relations observées par séquençage 16S (alignement multiple) et MALDI TOF. Cependant, nous notons, à ce stade, que l'utilisation des gènes *ADNr 16S* a ses propres limites et qu'il faut multiplier les méthodes d'analyse pour aboutir à une identification plus précise et plus crédible.

Conclusion & perspectives

Le premier objectif de ce travail est une contribution méthodologique à l'appréciation qualitative du risque bactériologique lié à la production de lait reconstitué pasteurisé. A l'aide d'une série de contrôles bactériologiques, réalisés sur des produits à différents sites de la chaîne de fabrication du lait reconstitué pasteurisé, nous cherchons à mettre en évidence les facteurs participant à la contamination des produits en cours de fabrication et influençant leur niveau de contamination par évaluation de la qualité des plans de contrôles effectués en usine et par l'établissement des recommandations.

Le deuxième objectif de cette étude est d'évaluer la crédibilité de l'outil biomoléculaire (Séquençage ADN_r 16S et MALDI TOF MS) dans l'identification des isolats par l'emploi des approches bioinformatiques telles que les alignements multiples et la prédiction des structures secondaires. Celles-ci peuvent contribuer effectivement dans la distinction rapide des isolats comme cela a été démontré par nos résultats.

La première partie de ce travail a concerné l'évaluation de la qualité hygiénique des échantillons de lait reconstitué pasteurisé prélevé à différentes étapes de leur chaîne de fabrication : Avant pasteurisation, après pasteurisation et produit fini destiné à la consommation. Nous avons pu montrer, à travers les résultats obtenus dans cette étude, que la contamination a eu lieu à tous les niveaux de la chaîne de production ; de la matière première au produit fini. Ceci met en exergue l'importance de l'établissement et la mise en œuvre d'une démarche HACCP et d'un système de traçabilité, pour une meilleure connaissance des flux de contamination à travers la ligne de production qui devrait aider à identifier les étapes critiques dans le processus de contamination. De plus, cette démarche va nous permettre de connaître les dangers biologiques relatifs conduisant donc à contrôler et améliorer la sécurité alimentaire en réduisant ou éliminant la contamination à la source.

Nous avons également évalué la performance de l'identification des bactéries isolées à partir des mêmes échantillons (matières premières, matières intermédiaires et produit fini), par l'utilisation de la technique MALDI-TOF MS. Ceci nous a permis de montrer qu'en dehors des techniques d'analyses microbiologiques usuelles, la spectrométrie de masse pourrait se révéler un atout dans le domaine de l'industrie agro-alimentaire, étant donné que tous les isolats bactériens ont été identifiés avec précision au niveau de l'espèce.

En comparaison avec la méthode génotypique réalisée dans cette étude (séquençage du gène *ADNr16S*) la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF remplit les exigences nécessaires à la confirmation et à l'identification des bactéries isolées du lait. Plus rapide que les méthodes de la microbiologie traditionnelle, moins coûteuse, nécessitant moins d'expertise technique que les méthodes génotypiques, et ayant le même niveau de discrimination que celles-ci, le MALDI-TOF MS peut en outre être utilisé dans les laboratoires de contrôles microbiologiques des denrées alimentaires pour des analyses de routine où le facteur temps joue un rôle clé pour la prise en charge des contaminations en temps réel.

En fin, l'utilisation combinée du MALDI TOF et les méthodes prédictives des structures secondaires semblent, selon nos résultats, une approche fiable pour le suivi de la contamination éventuelle dans la chaîne de fabrication du lait car elle apporte un double gain dans le temps et dans la précision de l'identification spécifique.

En termes de perspectives à venir, nous recommandons la constitution d'une équipe HACCP pluridisciplinaire incluant des spécialistes de la biologie moléculaire et de la bioinformatique pour apporter un meilleur suivi de l'hygiène et de la sécurité de la technologie du lait.

L'emploi des méthodes biomoléculaires, en particulier le MALDI TOF s'avère une nécessité pour l'identification rapide des espèces bactériennes et son intégrité dans les contrôles de qualité serait une valeur positive ajoutée.

La proposition d'algorithmes pour l'élaboration et le calcul des arbres de décision pour les CCP serait également d'une nécessité importante et sa programmation dans la démarche HACCP va contribuer à mieux désigner les points critiques de la chaîne de fabrication du lait.

Références bibliographiques

- AFNOR. 2007. Projet de norme NF V 01-002 "Hygiène des aliments -Glossaire français - anglais". Afnor V01C-N219, 23/10/2007. p: 50.
- Allali J. 2004. *Comparaisons de structures secondaires d'ARN*. Thèse de doctorat. Université Marne-la-vallée. France. 179 p.
- Allata S., Valero A., Benhadja L. 2017. Implementation of traceability and food safety systems (HACCP) under the ISO 22000:2005 standard in North Africa: The case study of an ice cream company in Algeria. *Food Control*. **79**: 239-253.
- Andersen Borge G.I., Skeie M., Sorhaug T., Langsrud T., Granum P.E. 2001. Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.* **69**: 237-246.
- Andronescu M., Aguirre-Hernández R., Condon A., Hoos H. H. 2003. RNA soft: a suite of RNA secondary structure prediction and design software tools. *Nuc. Ac. Res.* **31** (13): 3416-22.
- Arie F., Sri K., Ariesta W.A. 2012. Process engineering of drying milk powder with foam mat drying method. *J. Basic. Appl. Sci. Res.* **2**(4):3588-3592.
- Arnold, C., Barrett, a., Cross, L., et Magee, J. G. 2012. The use of *rpoB* sequence analysis in the differentiation of *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium chelonae*: A critical judgement in cystic fibrosis? *Clin. Microbiol. Inf.* **18**(5): 131-133.
- BA A. 2008. *Contribution à l'étude du lait et des produits laitiers importés au Sénégal : Étude économique et qualité hygiénique*. Doctorat en sciences vétérinaires. Université cheikh Anta Diop. Dakar. 171p.
- Baba T., Kuwahara-Arai K., Uchiyama I., Takeuchi .F, Ito T., and Hiramatsu K. 2009. Complete Genome Sequence of *Macroccoccus caseolyticus* Strain JSCS5402, Reflecting the Ancestral Genome of the Human-Pathogenic Staphylococci. *J. Bacteriol.* **191** (4): 1180-1190.
- Bariller J. 1997. *Sécurité alimentaire et HACCP, Dans « Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire »*.LARPENT J. P. Ed. Tec et Doc. Paris. pp 37-58.
- Bartoszewicza M., Hansenb BM., Swiecicka I. 2008. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* **25**: 588–596.

- Becker H., Schaller W., Von Wiese W., Terplan G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 1–15.
- Bohme K., Fernandez-No I. C., Pazos M., Gallardo J. M., Barros-Valazquez J., Canas B. *et al.* 2013. Identification and classification of seafood-borne pathogenic and spoilage bacteria: 16S rRNA sequencing versus MALDI-TOF MS fingerprinting. *Electrophoresis.* **34**: 877-87.
- Bouchoux G. and Sablier M. 2005. *Spectrométrie de masse - Principe et appareillage.* Techniques de L'ingénieur - Spectrométries base documentaire : TIB390DUO.
- Boutou O. 2008. *De l'HACCP à l'ISO 22000. Management de la sécurité des aliments.* AFNOR. 2^{ème} édition. ISBN : 978-2-12-440111-6. 330p.
- Bouziani M. 2006. *L'eau dans tous ses états.* Edition Dar el Gharb, Algérie.p190.
- Bright J. J., Claydon M. A., Soufia, M. et Gordon D. B. 2002. Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *J. Microbiol Method.* **48**(2-3): 127–38.
- Brisabois A. , Lafarge V., Brouillaud A., Buyser M. L., Collette(1) C., Garin-Bastuji B. & Thore M. F.1998. Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* **16** (1): 452-471.
- Broutin. C. 2005. *Maitrise de la qualité dans la transformation laitière.* Guide des bonnes pratiques d'hygiène. Sénégal.p
- Cahuzac, É., Hassan, D., & Monier-Dilhan, S. (2007). Sécurité sanitaire des aliments: fausse alerte et vraie crise. *Economie & prévision.* **148**.
- Cain T. C., Lubman D. M., Weber W. J., et Vertes A. 1994. Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **8** (12): 1026–1030.
- Chakravorty S., Helb D., Burday M, et Connell N. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Method.* **69**(2) : 330–339.
- Chamoret C. 2013. Appréciation de la pertinence de plans d'autocontrôle microbiologique. Thèse de doctorat. Campus vétérinaire de Lyon. p:10.
- Cheftel J.C *et al.* 1984. *Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments.* Volume II. Edition Lavoisier. Paris.

- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P. et Schrenzel J. 2010. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 1169-1175.
- Christensen H., Kuhnert P., Olsen J. E., Bisgaard M. 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the *16S rRNA* gene within the Pasteurellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1601-9.
- Christensen H., Kuhnert P., Olsen J. E., Bisgaard M. 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the *16S rRNA* gene within the Pasteurellaceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54** : 1601-9.
- Claeys W. L., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., et al. 2013. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control.* **31**(1): 251-262.
- Clarridge J. E. et Alerts C. 2004. Impact of *16S rRNA* gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**(4): 840–862.
- Claydon M. A., Davey S. N., Edwards-Jones V. et Gordon D. B. 1996. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotech.* **14**: 1584.
- Codex alimentarius. Hygiène des denrées alimentaires. Textes de base 4^{ème} édition OMS/FAO. ISSN 1020-2560. 152 pages.
- Coenye T., Vandamme P. 2003. Intragenomic heterogeneity between *16S* ribosomal RNA operons in sequenced bacterial genomes. *FEMS. Microbiol. Letts.* **228**: 45-49.
- Cornevaux P. É. I. 2013. Application de la méthode HACCP en élevage bovin laitier. Thèse de doctorat p: 180.
- Dauga C., Doré J., Sghir A. 2005. La diversité insoupçonnée du monde microbien. *Med Sci (Paris).* **21** : 290–296.
- De Luca, G., Zanetti, F., Stampi, S. Short communication. 1997. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. *Int. J. Food Microbiol.* **35**: 267-270.

- Dekio S., Yamasaki R., Jidoi J., Hori H. and Osawa S. 1984. Secondary structure and phylogeny of Staphylococcus and Micrococcus 5S rRNAs. *J. Bacteriol.* **159** (1): 233-237.
- Delbe's C., Montel M.C. 2005. Design and application of a Staphylococcus-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor Staphylococcus populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Let. Appl. Microbiol.* **41**: 169–174.
- Ding Y., Chan C., Y., Lawrence C. Y. 2005. RNA secondary structure prediction by centroids in a Boltzman weighted ensemble. *RNA.* **11**: 1157-66.
- Dolzani L., Tonin E., Lagatolla C. and Monti-Bragadin C. 1994. Typing of *Staphylococcus aureus* by amplification of the 16S-23SrRNA intergenic spacer sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**: 167-174.
- Dos Santos M.V., Barreiro J. R., Ferreira C. R., Sanvido G. B., Kostrzewa M., Maier T., Wegemann B., Böttcher V., Eberlin M. N. 2010. Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.* **93**: 5661-5667.
- Drancourt M. et Raoult D. 2002. rpoB gene sequence-based identification of Staphylococcus species. *J. Clin. Microbiol.* **40**(4): 1333- 8.
- Drancourt M., Bollet C., et Raoult D. (1997). *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**(1): 160-3.
- Drancourt M., Bollet C., Carlioz A., Martelin R., Gayral J. P., Raoult D. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38** : 3623-30.
- Durak M., Fromm H., Huck J., Zadoks R., Boor K. 2006. Development of molecular typing methods for Bacillus spp. and Paenibacillus spp. isolated from fluid milk products. *J. Food Sci.* **71**: 50-56.
- El-Hof M., El-Tanboly E. S., & Ismail A. 2010. Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to UF white cheese production line. *Acta Sci. Pol. Technol Aliment.* **9**(3): 331-342.

- Enquebaber Tarekgne, Skeiel S., Rudil K., Skjerdal T and Narvhus J. A. 2015. *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. *Afr. J. food Sci.* **9** (12): 567-576.
- Faille C., Bénézech T., Midelet-Bourdin G., Lequette Y., Clarisse M., Ronse G., Ronse A., Slomianny C. 2014. Sporulation of *Bacillus spp.* within biofilms: A potential source of contamination in food processing environments. *Food Microbiol.* **40**: 64-74.
- Fallmann J., Will S., Engelhardt J., Grüning B., Backofen R. 2017. Recent advances in RNA folding. *J. Bacteriol.* **261**: 97-104.
- FAO. 2010. Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine- Laites de consommation. <http://www.horizon.documentation.ird.fr> consulté 07/2018.
- Faye B. et Loiseau G. 2000. *Sources de contamination dans les filières laitières et exemple de démarches qualité in : gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement.* Edition CIRAD-FAO. pp: 1-5.
- Fenselau C. et Demirev P. A. 2001. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **20**(4): 157–171.
- Fernández-No I.C., Böhme K., Díaz-Bao M., Cepeda A., Barros-Velázquez J., Calo-Mata P. 2013. Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiol.* **33**: 235-242.
- Flint S.H, Bremer P.J, Brooks J.D. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling.* **11**(1): 81-97.
- Fontaine A. 2009. *Classification d'ARN codants et d'ARN non-codants.* Thèse Doctorat. Université Lille. France. 167pages.
- Food Product Association (FPA). 2006. *HACCP: A systemic approach to food safety.* Washington. D.C. FPA.
- Forsyth R.A., Haselbeck R.J., Ohlsen K.L., Yamamoto R.T., Xu H. and Trawick J.D. 2002. A genome-wide strategy for the identification of essential genes in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **43**: 1387-1400.
- Fox G. E., Wisotskey J. D and Jurtshuk P. 1992. How Close is Close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **42**: 166-170.

- Garcell H. G., Garcia E. G., Pueyo P. V., Martín I. R., Arias A. V., & Serrano R. N. A. 2016. Outbreaks of brucellosis related to the consumption of unpasteurized camel milk. *J. Infect. Public Health*. **9**(4): 523-527.
- Ghelardi E., Celandroni F., Salvetti S., Barsotti C., Baggiani A., Senesi S. 2002. Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**:129-134.
- Gould L. H., Mungai E., & Barton Behravesh, C. 2014. Outbreaks attributed to Cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathog. Dis.* **11**(7): 545-551.
- Guiraud J., Galzy P. 1980. *L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires*. Collections génie alimentaire. Ed l'usine. Paris.p:380.
- Haag A.M., Taylor S.N., Johnston K.H., Cole R.B. 1998. Rapid identification and speciation of *Haemophilus* bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry. *J. mass. spectrom.* **33**: 750-756.
- Hartmann C., Corre-Menguy F., Boualem A., Jovanovic M., Lelandais-Brière C. 2004. Les microARN. Une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique. *Méd. Sci.* **20**: 894-8.
- Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I and Britkolsto A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2627-2630.
- Heuvelin A. E., van Heerwaarden C., Zwartkruis-Nahuis A., Tilburg J. J., Bos M. H., Heilmann F. G., et al. 2009. Two outbreaks of campylobacteriosis associated with the consumption of raw cows' milk. *Int. J. Food Microbiol.* **134** (1-2): 70-74.
- Höchsmann M., Töller T., Giegerich R., Kurtz S. 2003. *Local similarity in RNA secondary structures*. In: Proc of the computational systems bioinformatics conference Stanford, CA, August 2003 (CSB 2003). pp: 159-68.
- Holland R. D., Wilkes J. G., Rafii F., Sutherland J. B., Persons C. C., Voorhees K. J., et Lay Jr J. O. 1996. Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Sp.* **10**(10): 1227-1232.

- Honish L., Predy G., Hislop N., Chui L., Kowalewska-Grochowska K., Trottier L., *et al.* 2005. An outbreak of *E. coli* O157:H7 Hemorrhagic colitis associated with unpasteurized Gouda cheese. *Canadian Journal of Public Health/Revue Canadienne De Sante'e Publique*. **96**(3): 182-184.
- Howard K.L. 2007. *Quantitative Analysis of Cyanobacterial Toxins by MALDI-TOF Mass Spectrometry* (ProQuest).
- IANOR. Institut Algérien de Normalisation. <http://www.ianor.dz>. Consulté en 2014.
- ISO 22000. 2005. Food safety management systems - requirements for any organization in the food chain. International Organization for Standardization.
- Jadhav S., Seviour D., Bhavé M., Palombo E.A. 2014. Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Proteomics*. **97**: 100-106.
- Janda J. M. et Abbott S. L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* **45**(9): 2761-2764.
- Jansřtova B., Dracřkova M., Vorlova' L. 2006. Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra high temperature processing. *Acta. Vet. Brno.* **75**: 601-609.
- Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G. 2008. *Les produits laitiers*. 2ème édition. Tec et Doc. Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).
- Jeantet R., Croguennec T., Schuck P., Brule G. 2006. *Science des aliments : biochimie - microbiologie - procédé – produits* (volume 1) : *stabilisation biologique et physico-chimique*, Ed. Tec et Doc. Paris. p: 383.
- Johler S., Weder, D., Bridy C., Huguenin M. C., Robert L., et al. (2015). Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a Swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.* **98**(5): 2944-2948.
- Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP). 2010. Décret exécutif n°10-90 du 10 mars 2010 complétant le décret exécutif n° 04-82 du 18 mars 2004 fixant les conditions et modalités d'agrément sanitaire des établissements dont l'activité est liée aux animaux, produits animaux et d'origine animale ainsi que de leur transport.

- Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP).1998. Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (JO N°35 du 27 mai 1998, P7).
- Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP). 2004. Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé. (JO N°70 du 07 novembre 2004, P20).
- Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire (JORADP). 2000. Arrêté du 27 Dhou El Hidja 1420 correspondant au 2 avril 2000, modifiant et complétant l'arrêté du 17 Rajab 1420 correspondant au 27 octobre 1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation , sa détention, son utilisation et sa commercialisation (JO N°19 du 05 Avril 2000, P15).
- Jouve J. L. 1994 .*La maîtrise de la sécurité et de la qualité des aliments par le système HACCP*. PP : 503-528, dans « La qualité des produits alimentaires : politique, incitations, gestion et contrôle » 2^{ème} édition, coordinateur : MULTON J. L. Ed. Tec et Doc Lavoisier. Paris.p: 754.
- Jouve J. L. 1996 (a). *La qualité microbiologique des aliments : maîtrise et critères*. (2^{ème} édition). Ed. Polytechnica, Paris. p: 563.
- Jouve J. L., Bourgeois C. M., Mescle J. F., Zucca J. 1996 (b) : *Le HACCP : un outil pour l'assurance de la sécurité des aliments*. pp: 495-509. dans « *Microbiologie alimentaire* ». Ed. Tec et Doc. Paris. p: 672.
- Jouve J. L. 1995. Quality and quality assurance: Microbiological quality and the HACCP system. OCL. *Oléagineux. corps gras. lipids*. p : 290-296.
- Kaci M., Yahiaoui S. 2017.*Etude lait conditionné et boissons lactées Algérie*. Ministère de l'industrie et des mines. p: 116.

- Kafetzopoulos D. P., Psomas E. L., & Kafetzopoulos P. D. 2013. Measuring the effectiveness of the HACCP food safety management system. *Food Control*. **33**(2): 505-513.
- Kassem M., Sale E., Ahwal A. M., Saddik M. & Gomaa, N. F. 2002. Application of hazard analysis and critical control point in dairy industry. *East Mediterr. Health J.* **8**(1): 114-128.
- Keys C.J., Dare D.J., Sutton H., Wells G., Lunt M., McKenna T., McDowall M., Shah H.N. 2004. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. Infection, genetics and evolution. *Infect. Genet. Evo.* **4**: 221-242.
- Kitahara K., Yasutake Y., Miyazaki K. 2012. Mutational robustness of 16S ribosomal RNA, shown by experimental horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *Proced. Nat. Acad. Sci.* **47**: 19220-5.
- Kloos W. E., Ballard D. N., George C. G., Webster J. A., Hubner R. J., Ludwig W., Schleifer K. H., Fiedler F., and Schubert K.. 1998. Delimiting the genus *Staphylococcus* through description of *Macrococcus caseolyticus* gen. nov., comb. nov. and *Macrococcus equiperficus* sp. nov., and *Macrococcus bovicus* sp. nov. and *Macrococcus carouselicus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 859-877.
- Kokkinakis E., Kokkinaki A., Kyriakidis G., Markaki A. & Fragkiadakis G. A. 2011. HACCP implementation in local food industry: A survey in Crete, Greece. *Procedia Food. Sci.* **1**:1079-1083.
- Krishnamurthy T., Rajamani U. et Ross P. L. 1996. Detection of Pathogenic and Nonpathogenic Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**(8): 883-888.
- Kumar M.P., Vairamani M., Raju R.P., Lobo C., Anbumani N., Kumar C.P., Menon T., Shanmugasundaram S., 2004. Rapid discrimination between strains of beta haemolytic streptococci by intact cell mass spectrometry. *Indian J. Med. Res.* **119**: 283-288.
- Kunst F., Ogasawara N., Moszer J., Albertini A.M., Alloni G. et al. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. **390**: 249-256.

- Küpfer M., Kuhnert P., Korczak B. M., Peduzzi R. et Demarta A. 2006. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**(12): 2743-2751.
- La Scola B., Fournier P. E., Raoult D. 2011. Burden of emerging anaerobes in the MALDI-TOF and 16S rRNA gene sequencing era. *Anaerobe.* **17**: 106-12.
- Lindström M., Myllykoski J., Sivela S., & Korkeala H. 2010. *Clostridium botulinum* in cattle and dairy products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **50**(4): 281-304.
- Lorenz R., Wolfinger M.T., Tanzer A., Hofacker I.L. 2016. Predicting RNA secondary structures from sequence and probing data. *Methods.* **103** : 86-98.
- M'boya J.C. 2001. *Groupe de Recherche et d'Echanges Technologique*. Edition: Lafayette. Paris. p: 121.
- M'boya J.C., Philippe B.C., Gret D. 2001. *Le lait pasteurisé*. Agridoc. p : 3.
- Maeda T., Takada N., Furushita M. and Shiba T. (2000). Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol.* **192**: 73-77.
- Mahaut M., Jeanet R., Schuck P et Bruli G. (2000). *Les produits industriels laitiers*. Ed. Tec & Doc: Lavoisier. Paris. ISBN: 2-7430-0429-0. pp: 1-138.
- Makambala Ndeke P.M. 2012. Contribution à l'étude de la conformité du lait sec microconditionné aux prescriptions réglementaires et normatives au Sénégal : Dakar. Thèse de doctorat. p: 98.
- Mannerova S., Pantucek R., Doskar J., Svec P., Snauwaert C., Vancanneyt M., Swings J., and Sedlacek I. 2003. *Macrococcus brunensis* sp. nov., *Macrococcus hajekii* sp. nov. and *Macrococcus lamae* sp. nov., from the skin of llamas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1647-1654.
- Mannerova S., Pantucek R., Doskar J., Svec P., Snauwaert C., Vancanneyt M., Swings J., and Sedlacek I. 2003. *Macrococcus brunensis* sp. nov., *Macrococcus hajekii* sp. nov. and *Macrococcus lamae* sp. nov., from the skin of llamas. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1647-1654.
- Meer R., Baker J., Bodyfel, F., Griffiths M. 1991. Psychrophilic *Bacillus spp* in fluid milk-product sea review. *J. Food Protect.* **54**: 969-979.

- Melo J., Andrew P. W. & Faleiro, M. L. 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* **67**:75-90.
- Meng L., Yang Q., Cheng J. et al. 2011. Study on the application of HACCP system in ice-cream premix powder processing. *J. Anhui Agric. Sci.* **39**: 6531-6533.
- Mollet, C., Drancourt, M., et Raoult, D. (1997). *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* **26**(5): 1005–1011.
- Motarjemi Y., Moy G. G., Jooste P. J. & Anelich L. E. 2014. *Milk and dairy products*. In Y. Motarjemi, & H. Lelieveld (Eds.), *Food safety management - a practical guide for the food industry*. pp: 83-117.
- Nada S., Ilija D., Igor T., Jelena M. & Ruzica, G. 2012. Implication of food safety measures on microbiological quality of raw and pasteurized milk. *Food Control.* **25**(2): 728-731.
- Oguntoyinbo F. 2007. Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *Afr. J. Biotechnol.* **6**: 163-166.
- Oliver S. P., Jayarao B. M., & Almeida R. A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. *Foodborne Pathog. Dis.* **2**(2): 115-129.
- OMS. (2015). Journée mondiale de la Santé 2015 : la sécurité sanitaire des aliments. <http://www.who.int/campaigns/worldhealth-day/2015/event/fr/>
- Papademas P., & Bintsis T. 2010. Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: A review. *Int. J. Dairy Technol.* **63**(4):489-503.
- Pascual J., Macian M. C., Arahal D. R., GARAY E. Pujalte M. J. 2010. Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 154-65.
- Pavlovic M., Huber I., Konrad R and Busch U. 2013. Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *Open Microbiol. J.* **7**: 135-141.
- Plan national de salubrité des aliments, avant- projet, FAO/OMS, Alger, septembre 2006. 111 pages.
- Quittet C., Nelis H. 1999. *HACCP pour PME et artisans : Secteur produits laitiers*. tome 1. Ed. Kuleuven et Gembloux. Bruxelles. p: 495.

- Reller L. B., Weinstein M. P. et Petti C. A. 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clin. Infect. Dis.* **44**(8): 1108–1114.
- Renvoisé A. 2012. Applicabilité de la PCR « universelle » 16S comme outil d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie. Thèse Doctorat. Université Aix-Marseille. France.
- Rige F., Cardon F., Doussin J.P. 2004 : *Gestion et prévention des risques alimentaires*. Ed. WEKA. Suisse. p : 421.
- Romby P., Marzi S., Westhof E. 2009. La structure atomique du ribosome en pleine lumière. *Med. Sci. (Paris)* **25** : 977–981.
- Rong X. et Huang Y. 2014. Multi-locus sequence analysis. Taking prokaryotic systematics to the next level. *Method. Microbiol.* **41**: 221–251.
- Salkinoja-Salonen M., Vuorio R., Andersson M., Kampf P., Honkanen-Buzalski T. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4637-4645.
- Schleifer K. H., Kilpper-Balz R., Fischer U., Faller A., and Endl J. 1982. Identification of “*Micrococcus candidus*” ATCC 14852 as a strain of *Staphylococcus epidermidis* and of “*Micrococcus caseolyticus*” ATCC 13548 and *Micrococcus varians* ATCC 29750 as members of a new species, *Staphylococcus caseolyticus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:15–20.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P., Rolain J. M. et Raoult D. 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**(4): 543–551.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La S.B., Fournier P.E., Rolain J.M et Raoult D. 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**:543-551.
- Senoussi A., 2008. Caractérisation de l'élevage bovin laitier dans le Sahara : Situation et perspectives de développement. In Colloque International « Développement durable des productions animales : enjeux, évaluation et perspectives ». Alger, 20-21 Avril 2008.

- Shin H. B., Yoon J., Lee Y., Kim M. S., Lee K. 2015. Comparison of MALDI-TOF MS, Housekeeping Gene Sequencing, and 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates. *Yonsei Med. J.* **56** (2) : 550-5.
- Smith C., Heyne, Richter A. S., Will S., Backofen R. 2010. Freiburg RNA Tools: a web server integrating IntaRNA, ExpaRNA and LocARNA. *Nucleic Acids Res.* **38** (Suppl): 373-7.
- Smithwell N., Kailasapathv K. 1995. Psychrotrophic bacteria in pasteurised milk: problems with shelf life. *Aust. J. Dairy Technol.* **50**: p28-31.
- Song Y., Liu C., McTeague M. and Finegold S.M. 2003. 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1363-1369.
- Soriano J. M., Rico H., Molto J. C. & Manes J. 2002. Effect of introduction of HACCP on the microbiological quality of some restaurant meals. *Food Control.* **13**(4-5): 253-261.
- Sorokulova I., Reva O., Smirnov V., Pinchuk I., Lapa S., Urdaci M. 2003. Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 169-173.
- Suarez, S. 2013. Microbiologie clinique et spectrométrie de masse. Thèse de doctorat. Université Paris Descartes. France.
- Tanaka K. 2003. The Origin of Macromolecule Ionization by Laser Irradiation (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.* **42** : 3860–3870.
- Veloo A. C. M., Jean-Pierre H., Justesen U. S., Morris T., Urban E., Wybo I., *et al.* 2018. Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project. *Anaerobe.* **54**: 224-30.
- Vignola C.L. 2002. *Science et technologie du lait –Transformation du lait.* École polytechnique de Montréal. ISBN: 29-34.p : 600.
- Wahl K.L., Wunschel S.C., Jarman K.H., Valentine N.B., Petersen C.E., Kingsley M.T., Zartolas K.A., Saenz A.J. 2002. Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal chem.* **74**: 6191-6199.

- Wang D., Wu H., Hu X., Yang M., Yao P., Ying C. J. *et al.* 2010. Application of hazard analysis critical control points (HACCP) system to vacuum-packed sauced pork in Chinese food corporations. *Food Control*. **21**(4): 584-591.
- Wang L. T., Lee F. L., Tai C. J and Kasai H. 2007. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16SrRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1846-1850.
- Wang W. Z., Morohoshi T., Someya N. & Ikeda T. 2012. AidC, a novel Nacylhomoserine lactonase from the potato root -associated cytophaga-flavobacteriabacteroides (CFB) group bacterium *Chryseobacterium sp.* strain StRB126. *Appl. Environ. Microbiol.* **78** (22): 7985–92.
- Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 1991 : 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**:697-703.
- Wenning M., Breitenwieser F., Konrad R., Huber I., Busch U., Scherer S. 2014. Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometrie. *Journal of Microbiological Methods*. **103**: 44-52.
- Wiley W.C., McLaren I.H. 1955. Time-Of-Flight Mass Spectrometer with Improved Resolution. *Rev. Scient. Instr.* **26**: 1150-1157.
- Woese C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**(2): 221–271.
- Youssef M.K, Y. X. (2013). Survival of acid-adapted Escherichia coli O157: H7 and not-adapted E.coli on beef treated with 2% or 5% lactic acid. *Food Control*. P: 13-18.
- Zucker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* **31** (13) : 3406-15.

Annexes

Annexe A

Méthodes de prélèvement des échantillons

1/Matières analysées et lieux des prélèvements

Dans le cadre de notre travail expérimental, les matières analysées après échantillonnage réglementaire, sont les suivantes:

- La poudre de lait (0% et 26%), destinée à la transformation, a été prélevée au niveau de la chambre de stockage pour des fins d'analyses microbiologiques.
- Le lait reconstitué avant pasteurisation et le lait pasteurisé (produit fini) ont fait l'objet de prélèvement au niveau de l'atelier de production de la laiterie, pour des éventuelles analyses microbiologiques.
- L'eau de reconstitution ou de process est prélevée directement du tank de lancement.

2/ Echantillonnages selon la norme Algérienne (NA 2394 : 1995).

L'échantillonnage est une étape importante dans la réalisation de ce travail ; il est effectué de sorte que l'échantillon soit le plus représentatif que possible de la denrée alimentaire. Le lieu et le moment de l'échantillonnage, le propriétaire, le producteur et d'autres indications nécessaires figurent sur la fiche d'analyse qui accompagne l'échantillon (nombre et poids de l'échantillon, numéro du lot, date de production, date de péremption et le type d'analyse à effectuer...).

Pour le transport ou l'expédition vers le laboratoire d'analyse, l'échantillon est conditionné de façon appropriée afin de prévenir toute détérioration.

Le matériel de prélèvement doit être parfaitement propre et stérile, de sorte qu'il n'exerce aucune influence sur les propriétés et la composition du produit à analyser.

Les échantillons sont soigneusement étiquetés et conservés.

- Matière première (la poudre de lait d'importation)

Pour les prélèvements de la poudre de lait, cinq (05) sacs pris au hasard, par lot (ayant le même code, la même date de production et de péremption). A l'aide d'une spatule à large lame stérile ; la couche superficielle de la poudre est écartée, de manière aseptique, une sonde

stérile suffisamment longue est alors enfoncée profondément dans le centre et au fond du sac, les doigts ne devant pas toucher la poudre.

Données relatives à la traçabilité de la poudre de lait :

	Poudre 0 %	Poudre 26 %
Source d'importation	ONIL*	ONIL*
Producteur	SPOLDZIELNIA MLECZARSK MLEKOVITA	SPOLDZIELNIA MLECZARSK MLEKOVITA
Pays producteur	Pologne U.E	Pologne U.E
Code usine de fabrication	PL28071601 WE	PL28071601 WE
N° de Lot	280	1578JY10
Poids	25 Kg	25 Kg
Date de fabrication	28/09/2014	28/09/2014
Date de péremption	28/09/2016	28/09/2016
Année d'exploitation	2015	2015
Laiterie exploitante	S.AR.L SUILAIT « Plamanova »	S.AR.L SUILAIT « Plamanova »

*Office national Interprofessionnel du Lait

- Lait pasteurisé conditionné

Cinq sachets de lait pasteurisé sont choisis au hasard (début, milieu et fin de production). Ces derniers doivent avoir le même volume et la même date de fabrication.

- L'eau de reconstitution (NA762 :1991)

Le prélèvement doit être réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Il faut utiliser de préférence des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon en verre rodé, ou mieux d'un bouchon à vis en métal ou de flacons à usage unique. Un écoulement de quelques minutes doit être réalisé avant le prélèvement. Celui-ci est précédé d'un flamage énergétique de l'ouverture d'écoulement à l'aide d'une lampe à souder portative. Le flacon de prélèvement est décapuchonné, ouvert de façon aseptique et rempli en évitant les contaminations, puis rebouché après flamage du col.

Annexe B

Normes des méthodes d'analyses microbiologiques

Norme Algérienne (NA)	Norme ISO	Désignation
NA2394:1995	Codex alimentarius	Préparation de l'échantillon dans l'hygiène alimentaire.
NA5912:2007	ISO 8261	Directives générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilution décimales en vue de l'examen microbiologique dans le lait et les produits laitiers.
NA762:1991	NE 15.15. 85	Echantillonnage d'eau en vue de l'analyse microbiologique
NA763:1991	ISO 6222	Dénombrement des germes totaux dans l'eau.
NA1207:1995	ISO 4833	Directives générales pour le dénombrement des microorganismes -méthode par comptage de colonies à 30° C.
NA6803:2005	ISO 4832	Directives générales pour le dénombrement des Coliformes -méthode par comptage par colonies.
NA2691:1992	FIL73 :1974	Dénombrement de bactéries Coliformes dans le lait et les produits laitiers.
NA1198:1995	ISO 6888	Directives générales pour le dénombrement des <i>Staphylococcus aureus</i> -méthode par comptage des colonies.
NA1203:1995	ISO 6579	Directives générales concernant les méthodes de recherche des Salmonelles.
NA764:1996	ISO 6461-1	Recherche des organismes Coliformes, des organismes Coliforme thermo- tolérants et d' <i>E.coli</i> présumée dans 'eau
NA765:1995	ISO 7899-1	Recherche et dénombrement de Streptocoques fécaux dans l'eau -méthode par enrichissement en milieu liquide.

Annexe C

Critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires (JORADP du 27 mai 1998 / JORADP du 2 avril 2000).

Produit	n	c	m	Référence
1- Lait déshydraté destiné aux industries alimentaires:				JORADP N° 19 du 2 avril 2000
-Germes aérobies à 30°C	1	-	2.10^5	
-Coliformes	1	-	10	
- <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46°	1	2	10	
-Antibiotiques	1	-	absence	
- <i>Salmonella sp</i>	1	-	absence/30g	
- Mycotoxines	-	-	absence	
2- Lait pasteurisé conditionné :				JORADP N° 35 du 27 mai 1998
-Germes aérobies mésophiles à 30°C	1	-	3.10^4	
-Coliformes totaux				
-à la sortie de l'usine	1	-	1	
-à la vente	1	-	10	
-Coliformes fécaux				
-à la sortie de l'usine	1	-	absence	
-à la vente	1	-	1	
- <i>Staphylococcus aureus</i>	1	1	négatif	
-Phosphatase				
3- Eau de distribution traitée:				
-Germes aérobies à 37°C/ml.	1	-	20	
-Germes aérobies à 22°C/ml.	1	-	$<10^2$	
-Coliformes aérobies à 37°C/100ml.	1	-	<10	
-Coliformes fécaux/100ml.	1	-	absence	
-Stréptocoques D/50ml.	1	-	absence	
- <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46°C/ml.	1	-	absence	
- <i>Clostridium</i> sulfito-réducteurs à 46°C/20ml	1	-	<5	

Annexe D

Préparation de la matrice (MALDI-TOF)

La matrice utilisée dans l'analyse protéomique est préparée avec l'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique dans un mélange de 475 μL d'eau de qualité HPLC, 25 μL d'acide trifluoroacétique et 500 μL d'acétonitrile dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Après avoir vortexé la solution pendant quelques secondes, elle est soniquée pendant 10 min. Puis la solution est centrifugée pendant 5 min à 13000 g. Le surnageant retenu et utilisé comme matrice.

Annexe E

Alignement multiple des séquences *ADNr16S* des 5 isolats

CLUSTAL FORMAT: MUSCLE (3.7) multiple sequence alignment

```
Bacillus_c      ---GTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGC
Bacillus_s      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAGC
Bacillus_l      -----

Bacillus_c      GAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
Bacillus_s      GGACAGA-TGGGAGCTTGCTCCC-TGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
Bacillus_l      -----

Bacillus_c      AACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTT
Bacillus_s      AACCTGCCGTAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGTTGTTT
Bacillus_l      -----

Bacillus_c      GAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGC-TTCGGCTGCACCTTATGGATGGACCGCG
Bacillus_s      GAACCGCATGGTTCGAAATATAAAGGTGGC-TTCGGCTACCACTTACAGATGGACCGCG
Bacillus_l      -----TTCAATCATAAAAGGTGGCTTTCAGCTACCACTTACAGATGGACCGCG
                *** * * ***** ** ** ** * ** * ** * ** * ** * ** *

Bacillus_c      TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
Bacillus_s      GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
Bacillus_l      GCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
                *****

Bacillus_c      GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
Bacillus_s      GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
Bacillus_l      GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
                *****

Bacillus_c      AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
Bacillus_s      AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
Bacillus_l      AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
                *****

Bacillus_c      TTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCAC
Bacillus_s      TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCCTTCGAATAGGGCGGTAC
Bacillus_l      TTTCGGATCGTAAATCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCCTTCGAATAGGGCGGTAC
                ***** ** * ** * ** * ** *

Bacillus_c      CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
Bacillus_s      CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
Bacillus_l      CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
                *****

Bacillus_c      TAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGTTTCTTAAG
Bacillus_s      TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGCTCGCAGCGGTTTCTTAAG
Bacillus_l      TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGTTTCTTAAG
                ***** ** * ** * ** * ** *

Bacillus_c      TCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGT
Bacillus_s      TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGT
Bacillus_l      TCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAACTTGAGT
                *****

Bacillus_c      GCAGAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAAC
Bacillus_s      GCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
Bacillus_l      GCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAAC
                *****

Bacillus_c      ACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
Bacillus_s      ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
Bacillus_l      ACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAC TGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGA
                *****

Bacillus_c      GCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA
```

Bacillus_s GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGG
Bacillus_l GCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGA
** *****

Bacillus_c GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGC
Bacillus_s GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGT
Bacillus_l GGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGT
***** ** *****

Bacillus_c CGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
Bacillus_s CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
Bacillus_l CGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
***** *****

Bacillus_c TAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGA
Bacillus_s TAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGA
Bacillus_l TAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCCTTGACATCCTCTGACAACCTAGAGA
***** *****

Bacillus_c TAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTC
Bacillus_s TAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTC
Bacillus_l TAGGGCTTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTC
*** * ** *****

Bacillus_c GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCATCATT
Bacillus_s GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATT
Bacillus_l GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG-CAGCATT
***** ** *****

Bacillus_c AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
Bacillus_s AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
Bacillus_l AGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA

Bacillus_c ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCT
Bacillus_s ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCA
Bacillus_l ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAGAAACAAGGGCA
***** * * *****

Bacillus_c GCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCTCAGTTCCGATTGTAGGCTGC
Bacillus_s GCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGC
Bacillus_l GCGAAGCCGCGAGGCTAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCCGATCGCAGTCTGC
** * ***** ** * ** * ***** * * ** *

Bacillus_c AACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
Bacillus_s AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
Bacillus_l AACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
***** ** * *****

Alignement des espèces Staphylococciques

CLUSTAL FORMAT: MUSCLE (3.7) multiple sequence alignment

```

Staphylo_c      TTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAACA
Staphylo_u      -----GAAACTCAAAGGAATT
                      * * * * *

Staphylo_c      GATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT-----
Staphylo_u      GACGGGGACCC-----GCACAAGCGGTGG-----AGCATGTGGTTAATT
**  ***  *          *  *****  *          *  **  *****  *

Staphylo_c      --AACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATT
Staphylo_u      CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAAC TCTAGAGA-----
          * * * * *  * * *  * * * * *  * * * *  * * * *  * * * *

Staphylo_c      TAGAACCGCATGGTTC-----TAAAGTAAAAGATGGT-----TTTGCTATCACTTATAG
Staphylo_u      TAGAGCCTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA-----
*****  **      ***      *****  **  *****      ***  ***

Staphylo_c      ATGGACCCGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAAC-----G
Staphylo_u      ---GCTCGTGTCTGTG--AGATGTTGGGTTAAGTCCCG--CAACGAGCGCAACCCTTAAG
          * * * * *  * * *  * * * * *  * * *  * * *  * * *  *

Staphylo_c      ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGG--AACTGAGACACGGTCCAGA
Staphylo_u      CTTAGTTGCCATCATT-----AGTTGGGCACCTAGGTTGACTG-----CCGGT
          * * * * *  * * *  * * * * *  * * *  * * *  * * *

Staphylo_c      CTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA-----
Staphylo_u      GACAAACCGGAGGAAG--GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGC
          * * * * *  * * * * *

Staphylo_c      ----ATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCC TGACGG--AGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGG
Staphylo_u      TACACACGTGCTACAATGGACAATA--CAAAGGCAGCTAAACCGCG-----AGG
          * * *  * * * * *  * * *  * * * * *  * * * * *  * * *

Staphylo_c      TC-TTCGGATCGTAAAACCTGTATTAGGGAAGAACA-AATGTGTAAGTAACATGCAC
Staphylo_u      TCAWGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAA-----
**  *  * * *  * * *  * * *  * * *  * * *  * * * * *

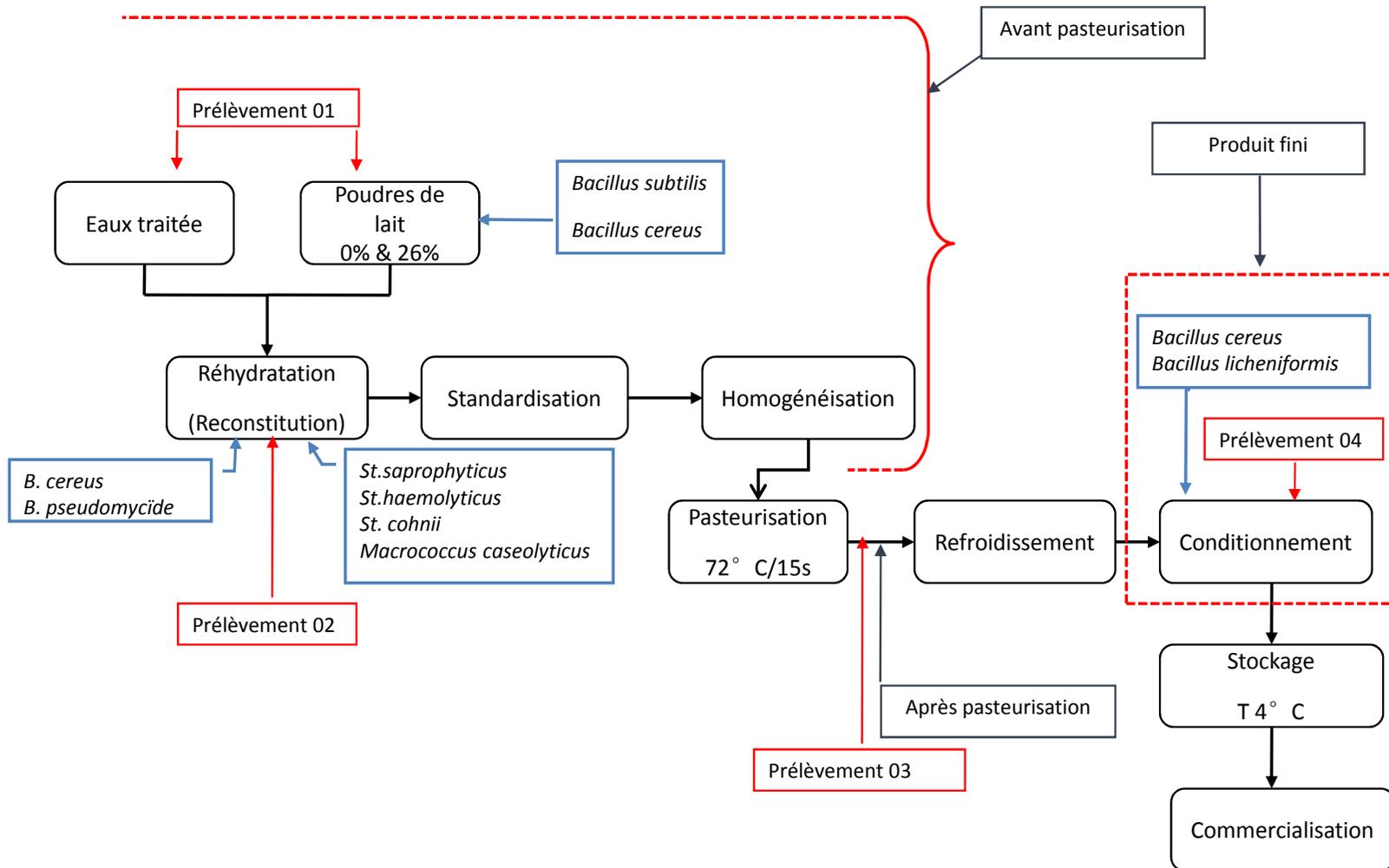
Staphylo_c      GTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCA-GCCGCGGT-AA
Staphylo_u      --CTCGACTACATGAAGCTGGAA--TCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAA
          **  ***  *  *  * * *  * *  * * *  * * * * *  * * * * *

Staphylo_c      TACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCT-----AGGC
Staphylo_u      TACGT-----TCCGGGTCTT---GTACACACCGCCGTCACACCACGAG
*****          ***  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

Staphylo_c      GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCA--TTGGAAC
Staphylo_u      AGTTTGTAAACCCG-----AAGCCGGTGGAGTAACCATTGGAGCTAGCCGTCGAAG
          ****  *  *  *  *  *  * * * * * * * * * * * * * *

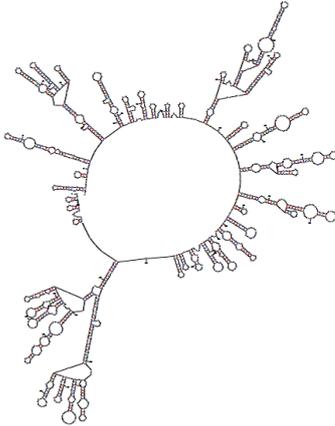
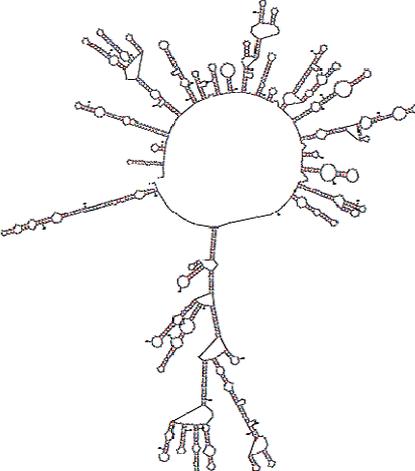
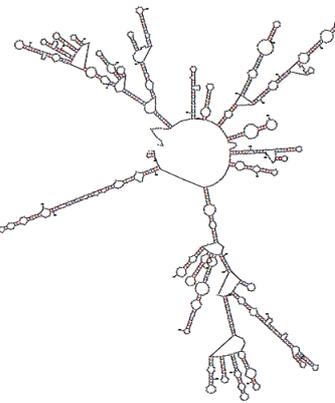
Staphylo_c      TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGG-----AAAGTGAATTCC-----
Staphylo_u      TGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG----CCGTAGGG
*****  *  * * * *  *  * *          * * * *  * *
    
```

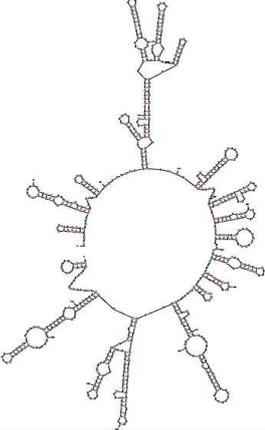
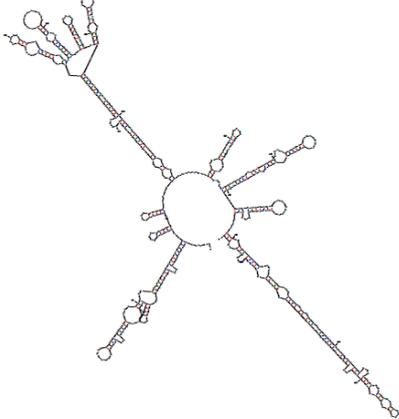
Annexe F
Espèces isolées des différents sites de prélèvements



Annexe G

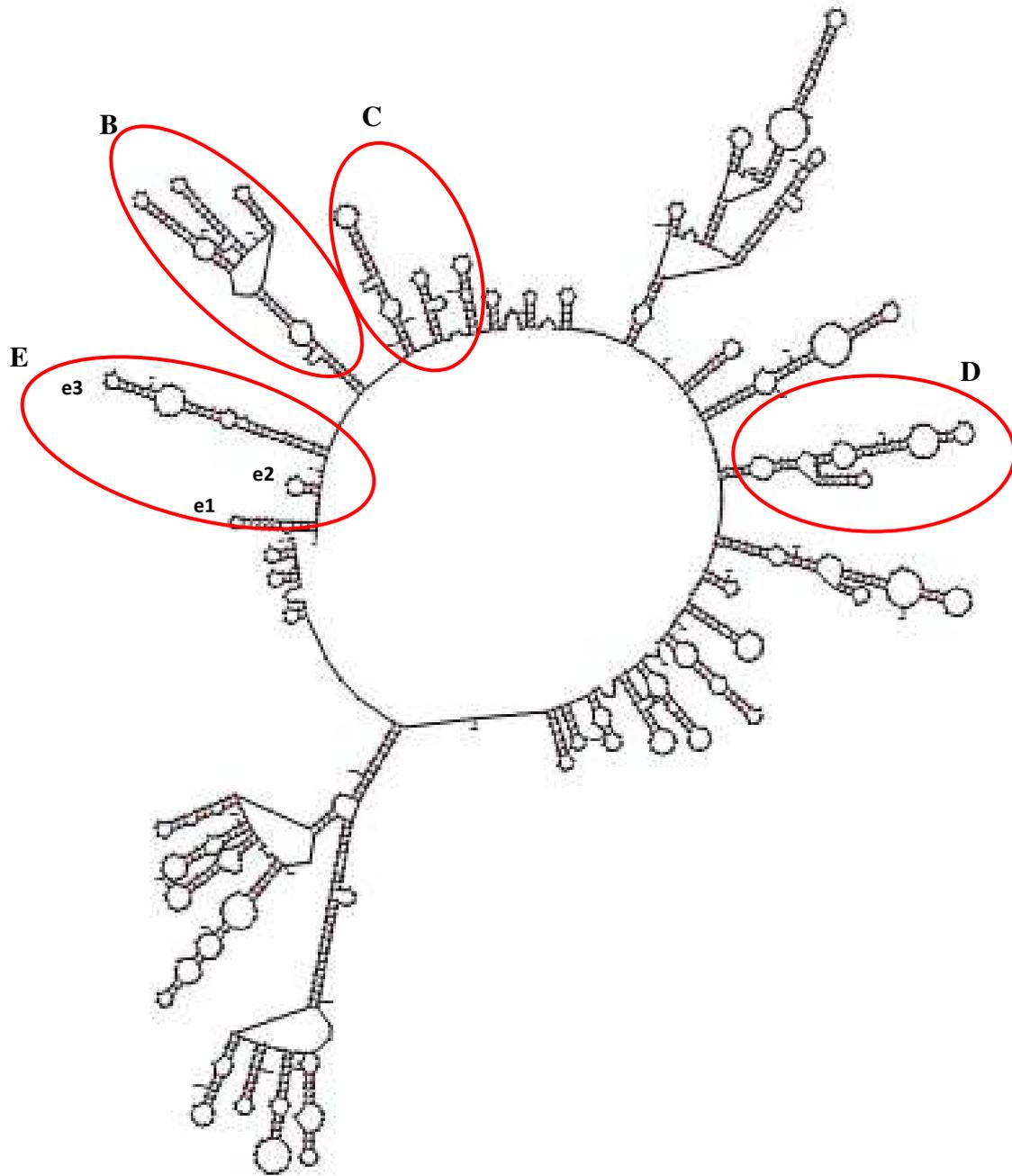
Tableau des structures 2D du gène *ADNr 16S* des différents isolats et leurs énergies libres ΔG° .

Isolat	<i>ADNr 16S</i>		
	Structure 2D	Nbre de pb	ΔG° Kcal/mol
B1 <i>Bacillus cereus</i>		1450	-468.00
B2 <i>Bacillus subtilis</i>		1502	-513.80
B3 <i>Bacillus licheniformis</i>		1327	-433.80

<p>C1 Staphylococcus cohnii</p>	 <p>A circular phylogenetic tree for Staphylococcus cohnii. The tree is centered around a large white circle. Numerous branches radiate outwards from this center, each ending in a small black circle representing a taxon. The branches are of varying lengths and thicknesses, indicating different evolutionary distances and relationships between the taxa.</p>	<p>675</p>	<p>-210.20</p>
<p>C 2 Staphylococcus saprofiticus</p>	 <p>A circular phylogenetic tree for Staphylococcus saprofiticus. The tree is centered around a large white circle. Several long, prominent branches radiate outwards, each ending in a small black circle representing a taxon. There are also several shorter branches. The overall structure is more elongated and less dense than the tree for Staphylococcus cohnii.</p>	<p>612</p>	<p>-175.00</p>

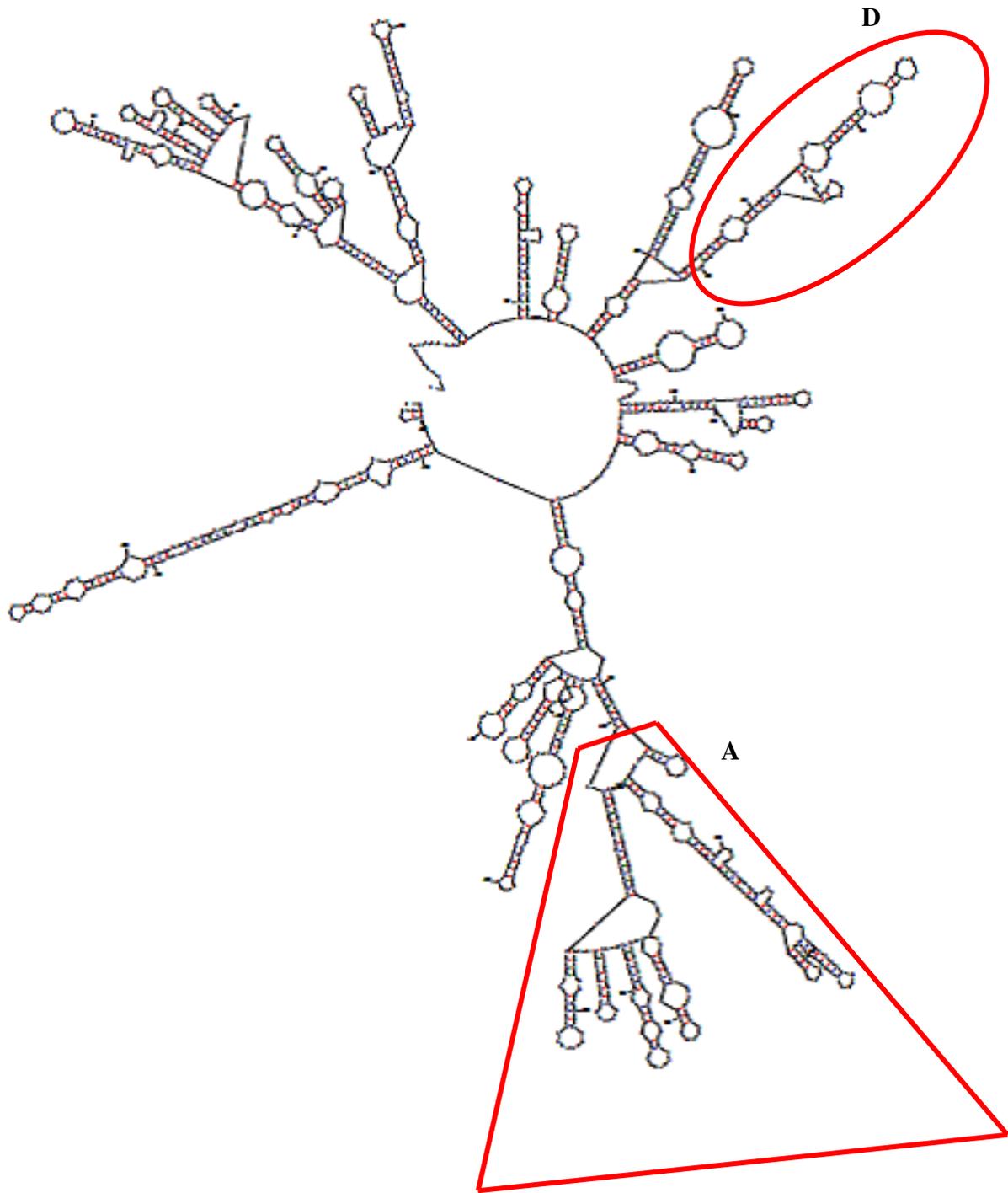
Annexe H

Représentation schématique de la structure 2D avec motifs



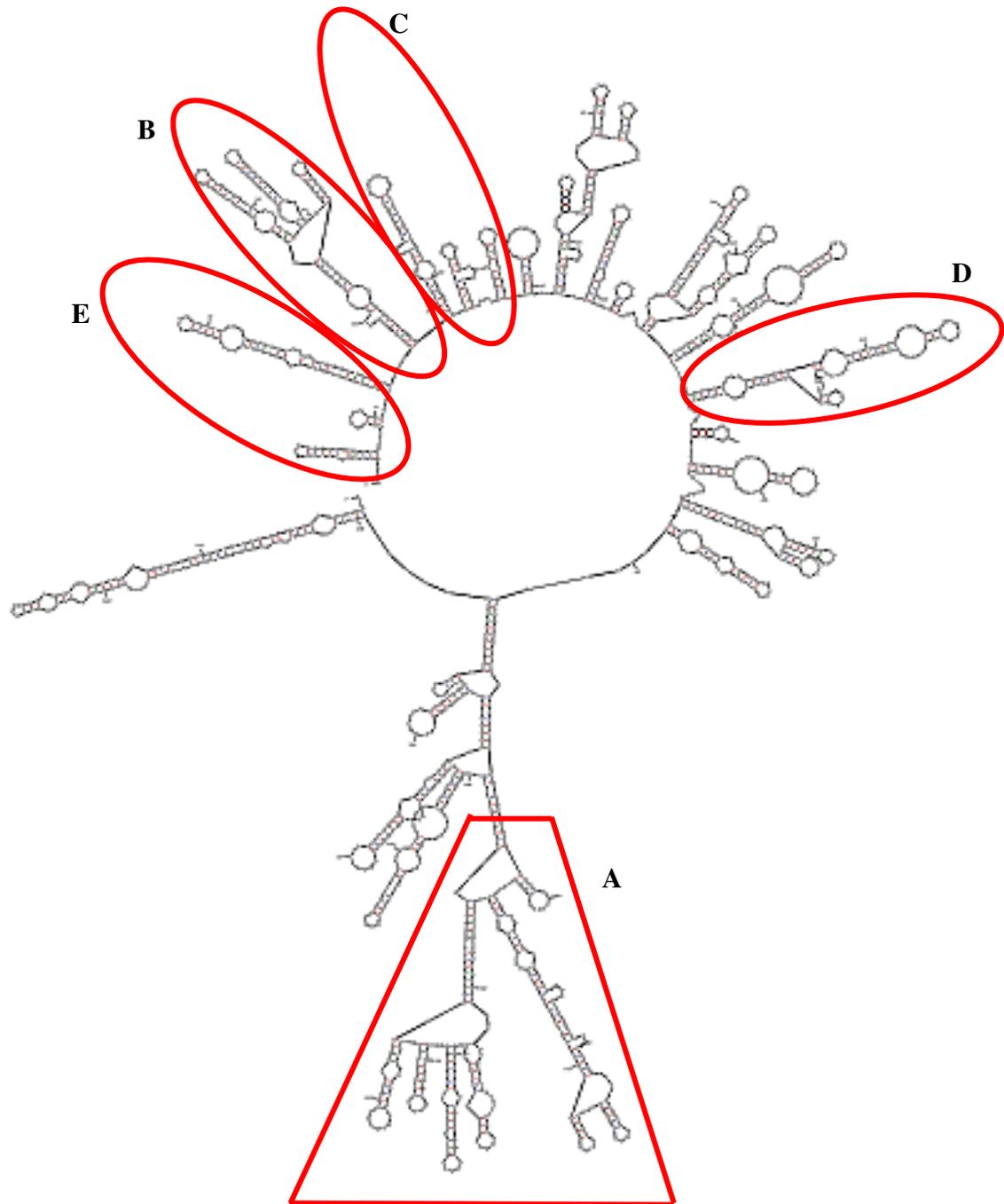
Bacillus cereus

Annexe H (suite)



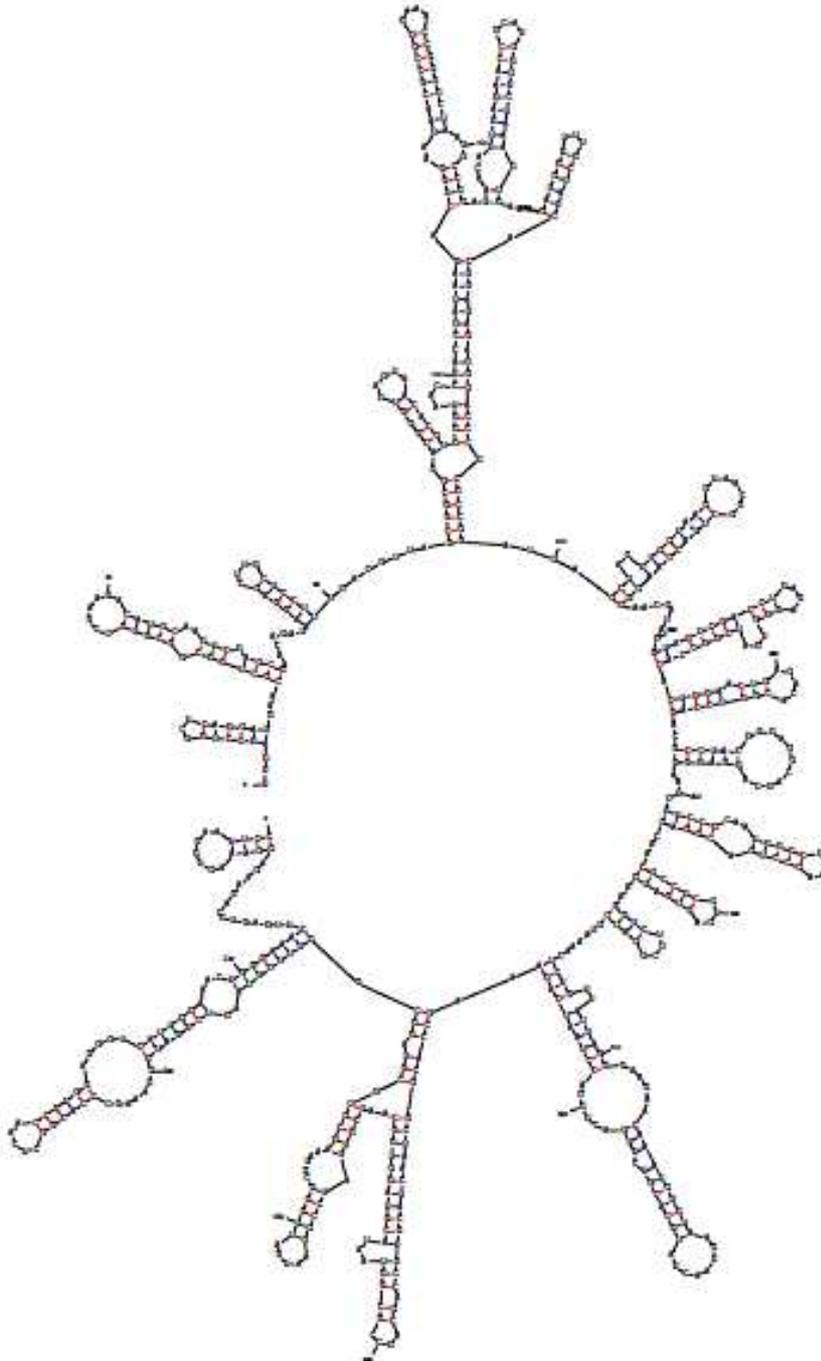
Bacillus licheniformis

Annexe H (suite)



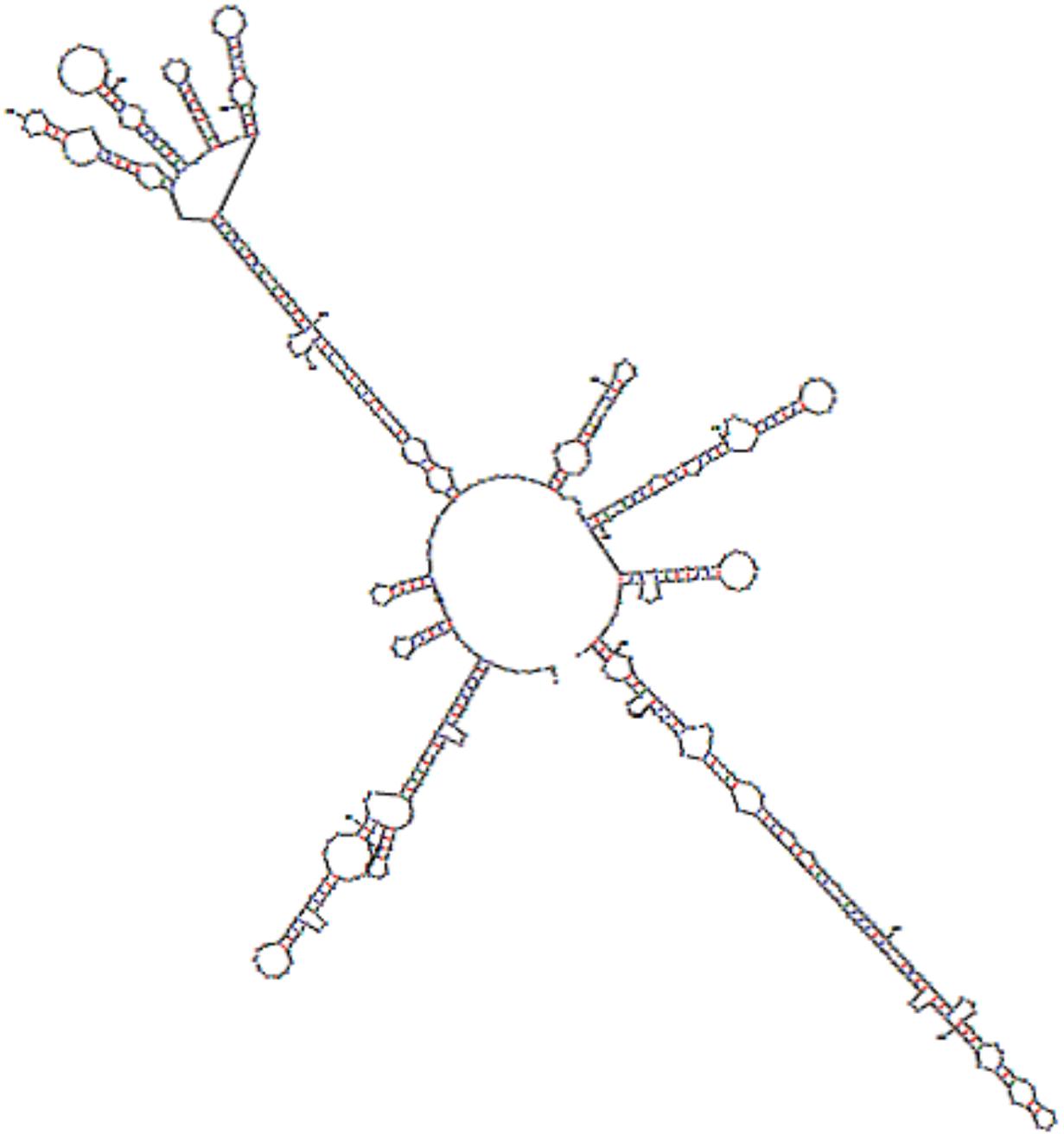
Bacillus subtilis

Annexe H (suite)



Staphylococcus cohnii

Annexe H (suite)

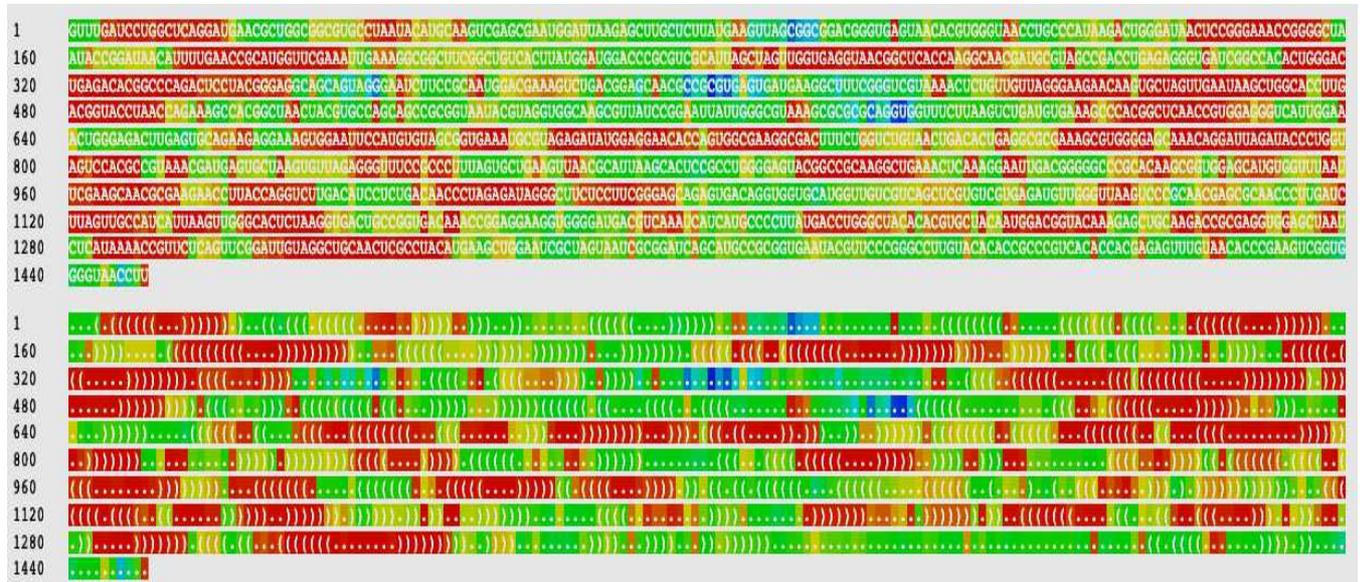


Staphylococcus saprophyticus

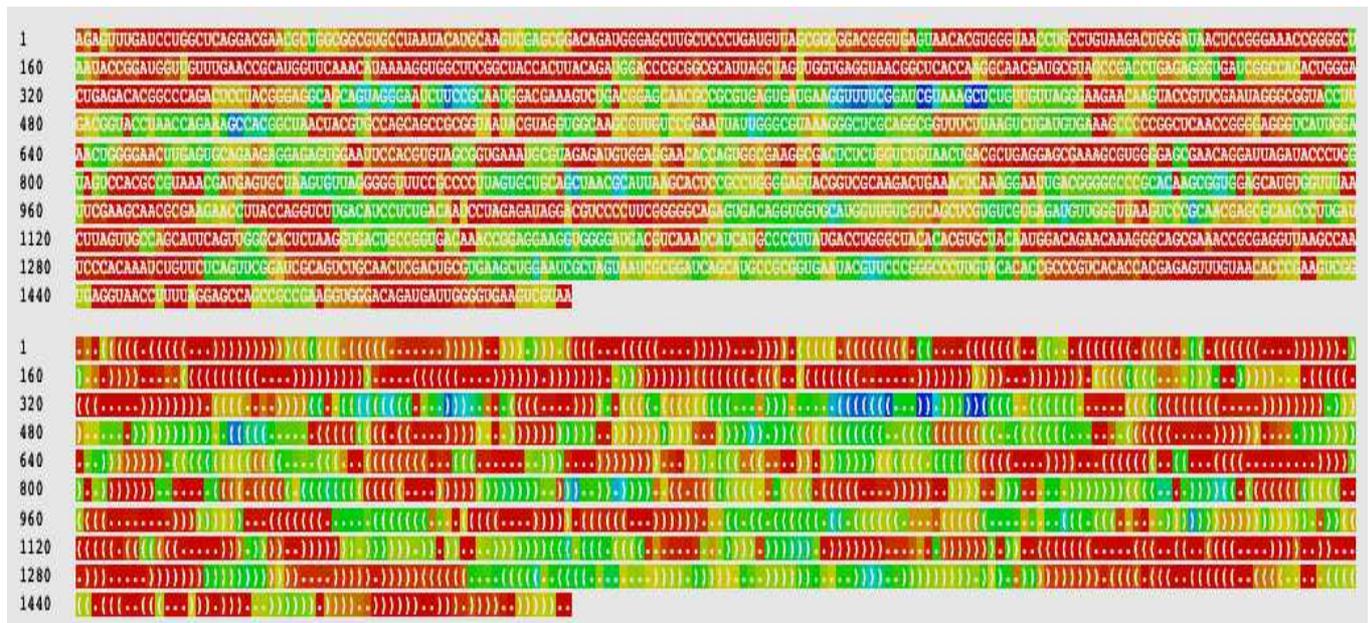
Annexe I

Format parenthésé des cinq isolats bactériens

Bacillus cereus

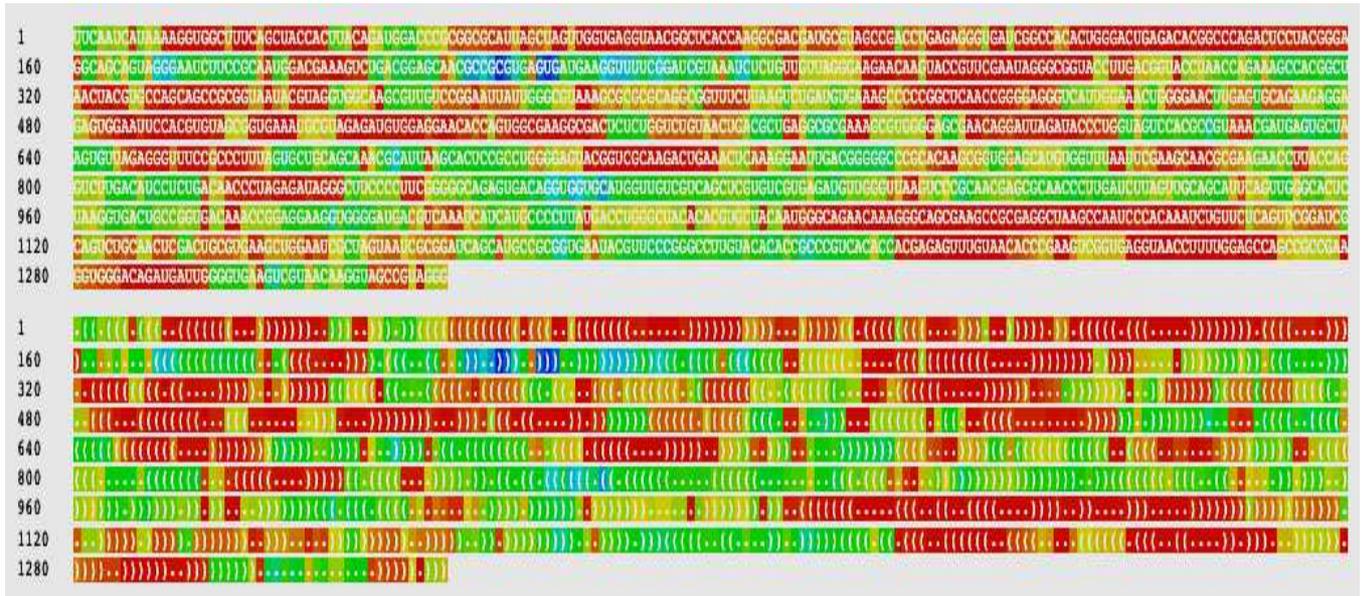


Bacillus subtilis

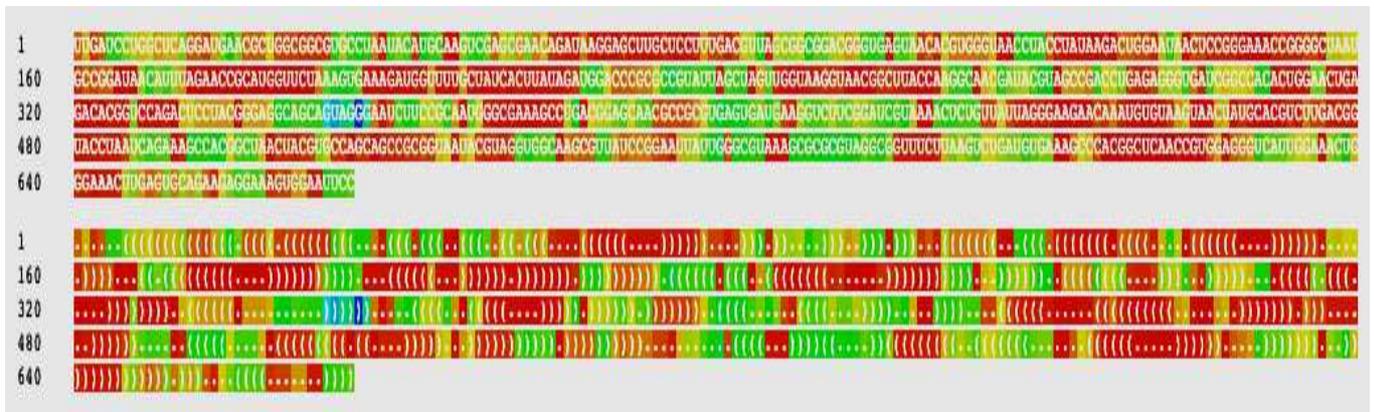


Annexe I (suite)

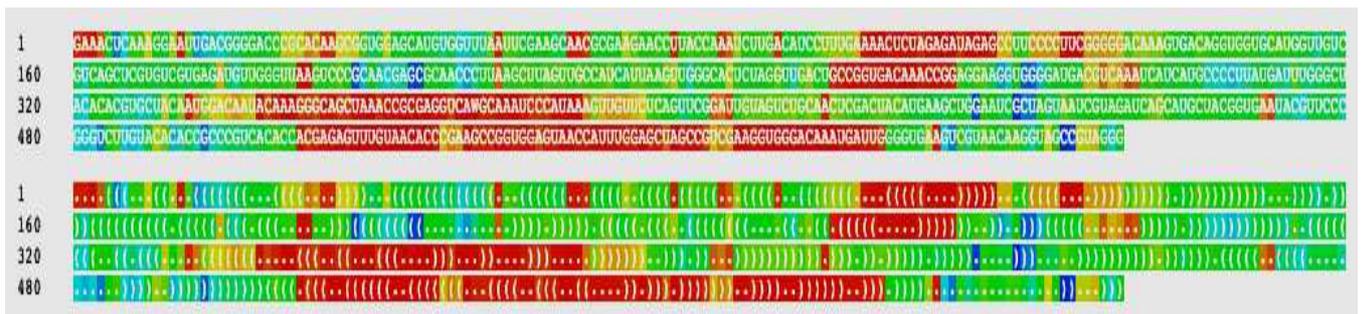
Bacillus licheniformis



Staphylococcus cohnii

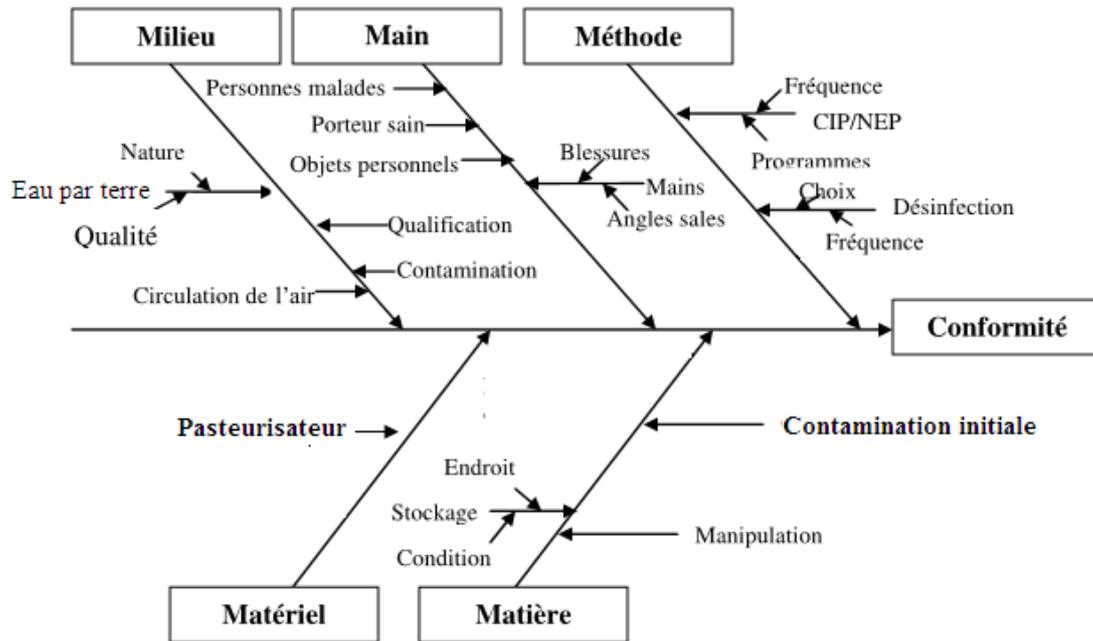


Staphylococcus saprophyticus



Annexe J

Causes et origines des dangers bactériens identifiés pour chaque étape de la production décelés par la méthode des 5M d'ISHIKAWA.



RÉSUMÉ

L'objectif visé par cette étude est, d'une part, de mettre l'accent sur l'importance de l'adoption d'un système d'évaluation du risque microbiologique et d'autre part, d'évaluer la méthode MALDI-TOF MS en tant qu'outil efficace et rapide pour l'identification d'isolats bactériens d'origine alimentaire.

Les résultats des analyses microbiologiques, des échantillons de lait reconstitué pasteurisé prélevés à différentes étapes de leur chaîne de production, comparés aux limites de conformité indiquées dans les normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les laits et produits laitiers dérivés de la réglementation algérienne en vigueur, ont montré une conformité au niveau de la FAM. La recherche des autres germes (Coliformes totaux et fécaux, *Clostridium* sulfito-réducteurs, *Salmonella sp* et *Staphylococcus aureus*) s'est révélée négative dans ces mêmes échantillons. Cependant, une contamination par des espèces de staphylocoques à coagulase négative est détectée.

Dans cette étude, 12 bactéries isolées à partir des mêmes échantillons de laits sont identifiées par MALDI-TOF MS, confrontée à l'ADNr 16S comme méthode de référence. Nos résultats montrent une grande fiabilité de l'identification par MALDI-TOF MS au niveau de l'espèce couvrant la totalité des isolats (100%) avec un score > 2. Cette étude suggère que comparativement au séquençage du gène de l'ADNr 16S qui fournit des résultats limités; le MALDI-TOF MS et l'analyse bioinformatique peuvent être utilisés pour une identification rapide et précise des agents d'altération et de pathogènes dans l'industrie laitière. Ces outils une fois intégrés à la mise en œuvre de systèmes préventifs tels que le système HACCP, améliorera sensiblement la sécurité alimentaire.

Mots clés : MALDI-TOF MS, ADNr 16S, lait reconstitué pasteurisé, HACCP, pathogènes.

ABSTRACT

The objective of this study is, firstly, to emphasize the importance of adopting a microbiological risk assessment system and secondly, to evaluate the MALDI-TOF MS method as an effective and rapid tool for the identification of foodborne bacterial isolates.

The microbiological analyzes results of the reconstituted pasteurized milk samples, collected at different stages of their manufacturing process, compared to the compliance limits indicated in the microbiological standards related to dairy products and derived products from the Algerian regulations in force, showed compliance at the level of the FAM, the search for other germs (Total and faecal Coliform , *Clostridium* sulfito-réducteur, *Salmonella* sp and *Staphylococcus aureus*) are revealed negative in these samples. However, contamination with coagulase-negative staphylococci species was detected.

In this study, 12 bacteria species isolated from the same milk samples are identified by MALDI-TOF MS confronted with the 16S rDNA as a reference method. Our results shows high reliability of MALDI-TOF MS identification at the species level covering all isolates (100%) with a score >2. This study suggests that compared to the sequencing of the *16S rDNA* gene that provides limited results; MALDI-TOF MS and bioinformatic analysis can be used for rapid and accurate identification of spoilage agents and pathogens in the dairy industry. These tools, once integrated with the implementation of preventive systems such as the HACCP, will significantly improve food security.

Key words: MALDI-TOF MS, 16S rDNA, pasteurized reconstituted milk, HACCP, pathogens.

ملخص

الهدف من هذه الدراسة هو من جهة التأكيد على أهمية اعتماد نظام لتقييم المخاطر الميكروبيولوجية ومن جهة أخرى تقييم طريقة MALDI كأداة فعالة وسريعة لتحديد العزلات البكتيرية من الأصل الغذائي.

أظهرت نتائج التحاليل الميكروبيولوجية لعينات الحليب المبستر المعاد تكوينه التي تم انتقاؤها في مراحل مختلفة من عملية التصنيع، مقارنة مع حدود الامتثال المطابقة للمعايير الجزئية المعمول بها والواجب توفرها في الحليب، توافق فيما يخص ال FAM. نتيجة البحث عن جراثيم أخرى

(Coliformes totaux et fécaux, *Clostridium* sulfito-réducteurs, *Salmonella* sp et *Staphylococcus aureus*)

كان سلبيا في نفس عينات الحليب الا انه تم الكشف عن تلوث ناتج عن وجود المكورات العنقودية سلبية التخثر.

في هذه الدراسة، تم تحديد 12 سلالة بكتيرية معزولة من نفس عينات الحليب باستعمال تقنية MALDI، مقارنة مع نظيرتها تقنية تسلسل جينات الحمض النووي ADNr 16S كوسيلة مرجعية.

أظهرت نتائجنا، موثوقية عالية لتحديد السلالات على مستوى النوع بنسبة تغطية كاملة 100% لجميع العزلات. هذه الدراسة تشير الى انه بالمقارنة مع تقنية تسلسل جينات الحمض النووي ADNr 16S التي تعطي نتائج محدودة فانه يمكن استعمال تقنية MALDI وتحليل البيولوجيا المعلوماتية من أجل تحديد أسرع ودقيق لمسببات التخثر والأمراض في مجال صناعة الألبان.

هذه الأدوات، إذا تم اعتمادها إلى جانب الأنظمة الوقائية مثل نظام HACCP ستحسن بشكل كبير سلامة الأغذية.

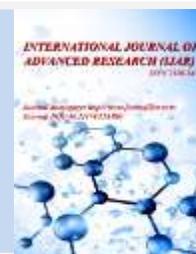
الكلمات المفتاحية: MALDI، ADNr 16S، اللين المبستر المعاد تشكيله، HACCP، مسببات الأمراض.

Production scientifique



Journal Homepage: -www.journalijar.com
**INTERNATIONAL JOURNAL OF
 ADVANCED RESEARCH (IJAR)**

Article DOI:10.21474/IJAR01/6665
 DOI URL: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/6665>



RESEARCH ARTICLE

APPLICATION OF MALDI- TOF MS TECHNOLOGY TO THE IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PATHOGENS IN DAIRY INDUSTRY.

Linda Boultifat*, assia guendouze and mohamed abdelhafid hamidechi.

Laboratory of cellular and molecular biology Microbiology Department, Natural Sciences and Life Faculty,
 Constantine 1 University, Ain El Bey Road - 25000 Constantine – Algeria.

Manuscript Info

Manuscript History

Received: 04 January 2018
 Final Accepted: 06 February 2018
 Published: March 2018

Keywords:-

MALDI-TOF MS, pathogens
 identification, pasteurized milk, dairy
 industry.

Abstract

The prerequisite of any microbial identification technique, especially in food industry, is its accuracy. Furthermore, it should be easy to perform, fast and cost-effective to ensure safe products and identify their microbial contamination. In this study, we tested Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) as an efficient tool allowing identification of bacterial isolates with high confidence and speed. Five bacterial species were isolated from pasteurized milk samples collected from different steps of their line production, in a local dairy company in Constantine, Algeria. The isolates were analyzed by MALDI-TOF MS method and results were compared with those provided by sequencing of the 16S rDNA gene in order to confirm the identification. All bacterial isolates were successfully identified by MALDI-TOF MS method to the species level (scores ≥ 2). In parallel, 16S rDNA gene sequencing analysis identified the five isolates to the species level ($\geq 99\%$ sequence similarity). The results of MALDI-TOF MS-based identification of the bacterial isolates studied showed a total concordance (100% same species) for isolates designed S1, S2 and B2 to those of the reference method (16S rDNA gene sequencing), except for two cases (isolate B1 and B3), where the identification by both proteomic and genomic methods coincided at the genus level. This study suggests that comparatively to 16S rDNA gene sequencing which provides limited results; MALDI- TOF MS is a highly sensitive and rapid method that could be used to identify pathogens in dairy industry.

Copy Right, IJAR, 2018,. All rights reserved.

Introduction:-

The detection and enumeration of pathogens in food is an important component of any integrated program to ensure the safety of foods throughout the food supply chain (Dos Santos et al., 2010). Food companies use microbiological analysis to identify microbial contamination, monitor its state at all times and analyze its trends so as to detect emerging risks. Microbiological analysis is an essential tool for carrying out tests in accordance with the microbiological criteria established for each food type, as well as being essential for evaluating the actions of different management strategies based on the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system (Stannard 1997; Jasson et al. 2010). These analysis, mainly based on the morphological, physiological and

Corresponding Author:- Linda Boultifat.

Address:- Laboratory of cellular and molecular biology Microbiology Department, Natural Sciences and Life Faculty, Constantine 1 University, Ain El Bey Road - 25000 Constantine – Algeria.

biochemical tests, either before enrichment (quantitative or enumerative methods) or after enrichment (qualitative methods, also known as presence/absence tests), allow the identification of most bacterial isolates with great accuracy, but they are costly and time-consuming. The methods based on genetic markers, are often quite cost intensive and difficult to implement in routine food analysis (Dos Santos et al., 2010). Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) has recently emerged as a rapid and accurate identification method for bacterial species (Jadhav et al., 2015). Compared with DNA analysis based technologies, MALDI-TOF MS requires smaller amounts of biological material and involves simpler sample preparation protocols with no initial assessment, such as Gram staining (Fenselau and Demirev, 2001; Mellmann et al., 2009; Ilina et al., 2010). In addition, this technique requires little MS expertise, the use of simple instruments, and relatively fast operator training (Dos Santos et al., 2010).

The MALDI-TOF MS technology has been used extensively in clinical diagnostics, however, its applicability to detection of foodborne pathogenesis comparatively is less explored (Jadhav et al., 2014; Pavlovic et al., 2013). In this context, our study aimed to evaluate the performance of MALDI-TOF MS based identification of pathogens in dairy industry.

Material and Methods:-

Samples collection:-

A total of three pasteurized milk samples were collected from different steps of their production process: before pasteurization, after pasteurization and ready to use product, in a dairy plant located in Constantine east of Algeria. The samples were collected aseptically in sterile containers, immediately kept in an ice box and transported to the laboratory. Samples were divided and used in triplicate for microbiology experiences.

Microbiological analysis:-

According to the standard method of the Official Journal of the Democratic and Popular Republic of Algeria, N°70 of 07th November 2004, the samples (described above) were investigated microbiologically for the total flora mesophilic aerobe, total and fecal coliform, the presence of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella sp* in order to appreciate their hygienic quality. The conditions and selective media used in this study are summarized in Table 1. Only Plate Count Agar (PCA) and Baird Parker Agar (BPA) plates, used respectively for the count of the total flora mesophilic aerobe and the search of *Staphylococcus aureus*, incubated under conditions indicated in table 1 were positive (giving visible growth). Single typical colony from each plate (PCA and BPA) was selected for this study. The selection of mesophilic colonies (growing on PCA) was based on their characteristics shape and color from countable plates (10 to 300). Colonies with typical *Staphylococcus* morphology on BPA medium (black, convex and with or without a light halo) were counted. Afterwards, the selected colonies were sub cultured to purity on the same medium plates and then subjected to molecular identification to species level by both proteomic and genomic methods.

MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis:-

The identification of the isolates by MALDI-TOF mass spectrometry protein analysis was carried-out as described by Seng et al., 2009. It was performed on a Microflex LT instrument (Bruker Daltonics GmbH, Leipzig, Germany) with FlexControl (version 3.0) software (Bruker Daltonics) for the automatic acquisition of mass spectra in the linear positive mode within a range of 2 to 20 kDa, according to the instructions of the manufacturer. Analysis of the raw spectral data was performed by the MALDI BioTyper automation (version 2.0) software (Bruker Daltonics); it makes use of a large database containing reference spectra. The score value is defined by three components, the matches of the unknown spectrum against the main spectrum, the matches of the main spectrum peaks against the unknown spectrum, and the correlation of intensities of the matched peaks. This leads to a first score, from 0 (no match) to 1,000 (perfect identity), which is converted into a log score from 0 to 3. When the score is greater than 2.0 is considered to indicate good species-level identification and scores above 2.3 correspond to excellent species-level identification. Values between 1.7 and 2.0 correspond to reliable genus-level identification and values below 1.7 indicate no identification (no significant similarity) (Cherkaoui et al., 2010). Sample preparation was performed according to the instructions of Bruker Daltonics. The bacterial isolates were grown on Columbia agar with 5% sheep blood (COSBA) and incubated for 24 hours at 37 °C. Colony was directly deposited on an MSP 96 target plate (Bruker Daltonics). The preparation was overlaid with 1µl of HCCA matrix solution, which is a (saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile- 2.5% trifluoroacetic acid). The colony was then air dried at room temperature to allow cocrystallization with the experimental sample. Each isolate was measured two times from three independent agar plates. At least two independent replicates out of three had to be concordant to be

taken as valid for species or genus identification. The spectra acquired by the mass spectrometer were then compared by using the BioTyper software.

Conventional PCR amplification and sequencing of the 16S rDNA gene:-

DNA extraction:-

The DNA extraction was carried out with the DNA tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) using EZ1 instrument (QIAGEN). Samples were prepared according to the appropriate procedure, in the EZ1 DNA Tissue Handbook, respecting the amount of starting material (200 µl). Colonies from each isolate were mixed with 180 µl of extraction buffer and 20 µl of proteinase K then incubated at 56°C overnight. The DNA can be analyzed immediately after the extraction or stored at -20°C until analyzing.

PCR amplification:-

The 16S rDNA gene, for all isolates, was amplified with the universal primers 16S_fd1 and 16S_rp2 (Weisburg et al., 1991). PCR reaction was carried out in a final volume of 50 µl. Reaction mixtures contained 1×PCR buffer with 5 µl template, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, desoxynucleoside triphosphate solution (200 µM each dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 0.2 µM each oligonucleotide primers and 0.5 units of Taq DNA polymerase. The thermal cycle consisted of an initial 10 min denaturation at 95°C followed by 39 cycles of 1min denaturation at 95°C, primer hybridization at 52°C for 30s and a final 5 min elongation step at 72°C. PCR reactions products were examined by electrophoresing and purified with the QIAquick spin PCR purification kit (Qiagen).

Sequencing:-

Sequencing was performed in ABI3700 automated capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) after a purification step of the PCR products, on the Sephadexplaq 5%, with the use of a BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Courtabeuf, France), the Bvd1, 5X Sequencing Buffer and the primers 357F, 357R, 536F, 536R, 800F, 800R, 1050F, 1050R (Table 2). The partial nucleotide sequences were combined into a single consensus sequence with ChromoasPro Software1.34 (Copyright (c) 2003-2006 by Technelysium Pty Ltd). The final obtained sequences were then compared with the GenBank database using BLAST software.

Results:-

All five bacterial species, isolated from pasteurized milk samples, gave spectra sufficient for species identification Figure. 1. As illustrated in Fig. 1 the MALDI-TOF MS profiles clearly differ in terms of number and intensity of mass signals. The obtained MALDI-TOF MS profiles were then compared to the reference spectra of the BioTyper database and their similarity was expressed by a BioTyper Log score. As shown in table 3, all isolates were identified to the species level (scores ≥ 2).

In parallel with MALDI-TOF MS identification, all bacterial isolates were analyzed by 16S rDNA gene sequencing, used as the reference method. By sequence comparison analysis, the five isolates were also identified to the species level ($\geq 99\%$ sequence similarity). The results of MALDI-TOF MS-based identification of the bacterial isolates studied showed a total concordance (100% same species) for isolate designed S1, S2 and B2 to those of the reference method; except for two cases (isolate B1 and B3), were the identification by both proteomic and genomic methods coincided at the genus level. B1 and B3 were identified as *Bacillus anthracis* / *Bacillus. cereus* and *Bacillus. Paralicheniformis* / *Bacillus. licheniformis* respectively by 16S rDNA sequencing and as *B. cereus* and *B.licheniformis* respectively by MALDI-TOF MS (Table 3).

Discussion:-

Bacteria play an important role in the food industry. They are used as starter cultures for cheese, yogurt or other fermented foods but they are also responsible for food-spoilage and food-poisoning. The identification and differentiation of food-related bacteria is indispensable for quality assurance and it is the basis for ensuring that safe (Wenning et al., 2014). Current microbiological techniques applied to foodborne pathogens detection are still based on usual approaches which are laborious and time consuming. On average, routine milk microbiological procedures take from 5 to 8 days to be completed and require the use of various biochemical tests and the evaluation of experts (Dos Santos et al., 2010).

Recently, bacterial identification at the molecular level has been investigated using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Fenselau and Demirev, 2001). Many microorganisms have been identified by MALDI-TOF MS via characteristic “chemical signatures” in a high-throughput fashion using straightforward extraction and sample work-up protocols. After initial bacterial growth that requires 1 day on average, and using crude bacterial extracts or lysate supernatants of whole cells, bacterial determination has been performed by MALDI-TOF MS in a few minutes (Holland et al., 1999; Dos Santos et al., 2010).

In this context, the main objective of this study was to evaluate MALDI-TOF fingerprinting in the identification of pasteurized milk associated pathogens taking in account specific requirement of milk microbiological identification protocols.

In total, five different species isolated from pasteurized milk samples, belonging to *Bacillus* and *Staphylococcus* genus were identified. The detection of contamination by species of *Bacillus* genus can probably be explained by their ubiquitous character and their large distribution in the environment as it has reported by Bartoszewicz et al., 2008, which facilitates their contamination in a variety of foods at different stages of the food chain (Oguntoyinbo, 2007). Contamination can be mediated through various substrates including soil, grain and dairy equipments (Bartoszewicz et al., 2008). Many studies have reported that *Bacillus cereus* spp are common contaminants in a wide variety of food, including milk and other dairy products (Becker et al., 1994; Reyes et al., 2007; Bartoszewicz et al., 2008). Remarkably, these species are able to survive pasteurization and produce endospores in raw and thermally processed foods (Durak et al., 2006).

In particular, contamination of milk by members of the *Bacillus cereus* group is of significance, not only because of their spoilage capability, but also because of their potential to cause human diseases (Andersen Borge et al., 2001; Jans̃tova´ et al., 2006). Indeed, *B. cereus* has been recognized to be a causative agent in food poisoning for more than 40 years and has been linked to foodborne emetic and diarrhoeal syndromes (Ghelardi et al., 2002). *B. licheniformis* has been associated with a variety of clinical syndromes and food poisoning incidents in humans, bovine toxemia and abortions (Salkinoja-Salonen et al., 1999), and food spoilage incidents such as ropy bread (Sorokulova et al., 2003). *B. subtilis* is not typically considered a human pathogen but may occasionally contaminate food and cause food poisoning (Fernandez et al., 2013).

The sampling along different steps of the pasteurized milk production chain, allowed also a detection of staphylococci contamination. Both genetic and proteomic techniques, used in this study, have successfully identified two species: *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus saprophyticus*. The presence of these species was probably due to contaminated environment and unhygienic manufacturing practices along the production chain. The same results showing the presence of these species in milk and other dairy products has been reported by many authors (De Luca et al., 1997; Delbe’s and Montel., 2005; Enquebaher Tarekgne et al., 2015).

In the present study, two isolates designed (B1 and B3) were identified as *B. cereus* and *B. licheniformis* by MALDI-TOF. However, 16S rDNA gene sequencing identified the isolate (B1) to be *B. anthracis* with 100 % of similarity with NCBI code (CP023001.1) and *B. cereus* with 100 % of similarity with the accession number (CP023179.1). This isolate identified as *B. anthracis* /*B. cereus* exhibited high similarity to both *B. cereus* and *B. anthracis* and were unable to be differentiated by this analysis. As it has demonstrated in the study by Helgason et al., (2000), *B. anthracis* is genetically very closely related to some *B. cereus* and *B. thuringiensis* strains. The same applies to isolate (B3), results from BLAST analyses fail to discriminate clearly between *B. licheniformis* and *B. paralicheniformis* because of the high homology of their sequences.

It is to highlight that these isolates (B1 and B3) were identified as *B. cereus* and *B. licheniformis* respectively on the basis of morphological characteristics presented by their colonies on Columbia Sheep Blood Agar medium, Gram staining and by the study of some of their biochemical characteristics (unpublished work).

Our results confirm previous studies reporting difficulties in the identification of certain foodborne *Bacillus* spp; due to similarities in their 16s rDNA sequences (Fernández-No et al., 2013). Interestingly MALDI-TOF MS identified these isolates with a high score (2,18 and 2,17) respectively for B1 and B3 (Tabale 3) showing its ability to differentiate between species in this group. In addition, from the data shown in Fig 1, it is also clear that MALDI-TOF MS provides characteristic protein profiles that allow for identification of different species from the same

bacterial genus. These results are comparable to those reported in the studies realized by Dos santos et al., (2010) and Fernandez et al., (2013). The finding in this study confirm the accuracy of the MALDI-TOF MS fingerprinting approach in identifying *Bacillus* species isolated from pasteurized milk.

The 16s rDNA gene sequencing was the reference standard for the identification of bacterial species used in the present study. This genomic method is regarded as the most widely accepted gene for bacterial identification (Song et al., 2003). However, as for any identification method, limitations for 16S rDNA gene sequencing exist (Janda and Abbott, 2007). Compared to MALDI TOF MS method, it was the least successful for identification, limited by the high homology of the species sequences.

Conclusion:-

In conclusion, our study showed that MALDI-TOF MS can be used for accurate and rapid identification of pasteurized milk related pathogens with high sensitivity and specificity and is therefore a potential alternative to the traditional phenotypic and genotypic methods that are currently used. This technique, once integrated with the implementation of preventive systems such as the HACCP will substantially improve food safety.

Table 1:- Selective media and conditions of incubation used for the investigated flora according to the Official Journal of Democratic and Republic Of Algeria.

Investigated flora	Selective medium	Incubation temperature (°C)	Incubation time	Reference
Total Flora Mesophilic Aerobe(TFMA)	Plate Count Agar (PCA)	30°C	72 hours	OJDROA* N°70 2004.
Total coliform	Desoxycholate-Citrate- Lactose- Agar (DCLA)	30°C	24 hours	OJDROA* N°70 /2004.
Feacal coliform	Desoxycholate-Citrate- Lactose- Agar (DCLA)	44°C	24 hours	OJDROA* N°70 /2004.
<i>Staphylococcus aureus.</i>	Baird Parker Agar (BPA)	37°C	24 hours	OJDROA* N°70 /2004.
<i>Salmonella sp.</i>	Enrichement on: -sélénite-cystine Broth -Muller Kauffmann supplemented with tétrathionate and Brilliant Green	37°C ± 1	48 hours	OJDROA* N°70 /2004.
		43°C ± 1	48 hours	
	Isolement on: Hektoen Agar	37°C	24 hours	

(*)Official Journal of Democratic and Republic Of Algeria N° 70 of the 07th December 2004.

Table 2:- Primers used in Conventional PCR amplification and sequencing of the 16S rDNA gene.

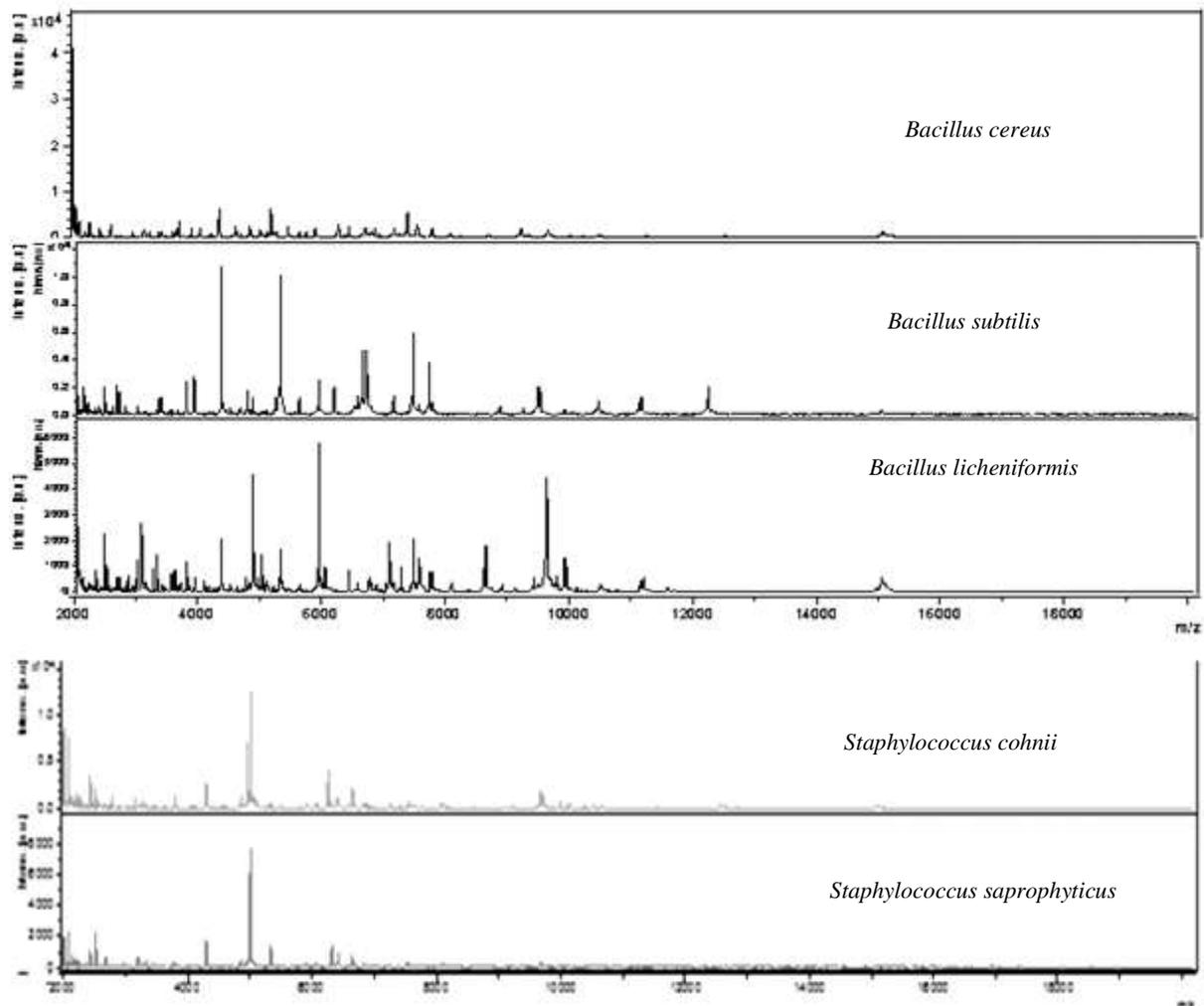
	Primers	Sequence (5'-3')	Tm* (°C)
Amplification	fD1	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	56
	rP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	62
Sequencing	357F	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	50
	357R	CTGCTGCCTCCCGTA	50
	536F	CTGCTGCCTCCCGTA	58
	536R	GTATTACCGCGGCTGCTG	58
	800F	GTATTACCGCGGCTGCTG	48
	800R	CTACCAGGGTATCTAAT	48
	1050F	TGTCGTCAGCTCGTG	48
1050R	CACGAGCTGACGACA	48	

*: Tm values were determined using the formula: $Tm = (2 \times AT + 4 \times GC) - 4$.

Table 3:- Comparison of 16S rDNA Sequencing and MALDI-TOF MS results for the 5 isolates.

isolate	16S rDNA gene sequencing		MALDI-TOF MS		
	Species ID*	Level of ID*	Species ID*	Level of ID*	Score
B1	<i>Bacillus anthracis</i> / <i>B. cereus</i>	Species	<i>Bacillus cereus</i>	Species	2,181
B2	<i>Bacillus subtilis</i>	Species	<i>Bacillus subtilis</i>	Species	2,124
B3	<i>Bacillus paralicheniformis</i> / <i>B. licheniformis</i> .	Species	<i>Bacillus licheniformis</i>	Species	2,179
S1	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Species	<i>Staphylococcus cohnii</i>	Species	2,213
S2	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Species	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Species	2,164

ID*: Identification.

**Figure 1:-** The characteristic protein profiles obtained for the 5 bacterial isolates by Matrix assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry.**Acknowledgment:-**

We are grateful to Professor Didier RAOULT and Professor Jean Marc ROLAIN from Aix Marseille University, Rickettsias unit, Medicine Faculty, Marseille, France for their assistance in MALDI-TOF MS analyses.

References:-

1. **Andersen Borge, G.I., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T., Granum, P.E.** (2001): Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 69: 237–246.
2. **Bartoszewicz, M., Hansen, B.M., Swiecicka, I.** (2008): The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiology.*, 25: 588–596.
3. **Becker, H., Schaller, W., von Wiese, W., Terplan, G.** (1994): *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int. J. Food Microbiol.*, 23 :1–15.
4. **Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P. and Schrenzel, J.** (2010): Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 1169–1175.
5. **De Luca, G., Zanetti, F., Stampi, S.** Short communication. (1997): *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. *International Journal of Food Microbiology.*, 35: 267–270.
6. **Delbe's, C and Montel, M.C.**(2005): Design and application of a *Staphylococcus*-specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Letters in Applied Microbiology.*, 41: 169–174.
7. **Dos Santos, M.V., Barreiro, J. R., Ferreira, C. R., Sanvido, G. B., Kostrzewa, M., Maier, T., Wegemann, B., Böttcher, V., Eberlin, M. N.,** (2010): Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Dairy Sci.*, 93:5661–5667
8. **Durak, M., Fromm, H., Huck, J., Zadoks, R., Boor, K.** (2006): Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. *Journal of Food Science.*, 71: M50–M56.
9. **Enquebaber Tarekne, Siv Skeie1, Knut Rudi1, Taran Skjerdal and Judith A. Narvhus.** (2015): *Staphylococcus aureus* and other *Staphylococcus* species in milk and milk products from Tigray region, Northern Ethiopia. *African Journal of food Science.*, 9 (12): 567-576.
10. **Fenselau, C. and Demirev P.A.** (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.*, 20:157–171.
11. **Fernández-No, I.C., Böhme, K., Díaz-Bao, M., Cepeda, A., Barros-Velázquez, J., Calo-Mata, P.** (2013): Characterisation and profiling of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food Microbiology.*, 33: 235-242.
12. **Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A., Senesi, S.** (2002): Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters.*, 208 :129-134.
13. **Helgason, E., Økstad, O.A., Caugant, D.A., Johansen, H.A., Fouet, A., Mock, M., Hegna, I and BritkolstØ, A.** (2000): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology.*, 66: 2627-2630.
14. **Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J and Lay, J.O.** (1996): Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 10:1227–1232.
15. **Irina, E. N., Borovskaya, A.D., Serebryakova, M.V., Chelysheva, V.V., Momynaliev, K.T., Maier, T., Kostrzewa, M and V. M. Govorun.** (2010): Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24:328–334.
16. **Jadhav, S., Seviar, D., Bhawe, M., Palombo, E.A.** (2014): Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI–TOF mass spectrometry. *Journal of Proteomics.*, 97: 100-106.
17. **Jadhav, Snehal, Gulati, Vandana, Fox, Edward M., Karpe, Avinash, Beale, David J.,**
18. **Janda, J.M. and Abbott, S.L.** (2007): 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, 45:2761–2764.
19. **Jans'tova, B., Drac'kova, M., Vorlova', L.** (2006): Effect of *Bacillus cereus* enzymes on the milk quality following ultra high temperature processing. *Acta. Vet. Brno.*, 75: 601–609.
20. **Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M.** (2010): Review. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.*, 27:710–730.
21. **Kostrzewa, M and V. M. Govorun.**(2010): Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the study of *Helicobacter pylori*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24:328–334.
22. **Mellmann, A., Bimet, F., Bizet, C., Borovskaya, A.D., Drake, R. R., Eigner, U., Fahr, A.M., He, Y., Irina, E.N., Kostrzewa, M., Maier, T., Mancinelli, L., Moussaoui, W., Prevost, G., Putignani, L., Seachord, C.L., Tang, Y.W and Harmsen, D.** (2009): High interlaboratory reproducibility of matrix-assisted

- laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based species identification of nonfermenting bacteria., J. Clin. Microbiol. 47:3732–3734.
23. **Official Journal of Democratic and Republic Of Algeria N° 70.** (2004) : Method of sample preparation for testing and dilutions for microbiological examination
 24. **Oguntoyinbo, F.** (2007): Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. African Journal of Biotechnology., 6: 163-166.
 25. **Pavlovic, M., Huber, I., Konrad, R and Busch, U.** (2013): Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. Open Microbiology Journal., 7: 135-141.
 26. **Reyesa, J.E., Basti'asa, J.M., Gutie'rreza, M.R., Rodri'guez, M.** (2007): Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. Food. Microbiology., 24 :1-6.
 27. **Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kampf, P., Honkanen-Buzalski, T.** (1999): Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. Applied and Environmental Microbiology., 65: 4637-4645.
 28. **Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La, S.B., Fournier, P.E., Rolain, J.M and Raoult D.** (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin. Infect. Dis., 49:543-551.
 29. **Sevior, Danielle, Bhave, Mrinal, Palombo, Enzo A.** (2015): Rapid identification and source-tracking of *Listeria monocytogenes* using MALDI-TOF mass spectrometry. Int. J. Food Microbiol., 202: 1-9.
 30. **Song, Y., Liu, C., McTeague, M. and Finegold, S.M.** (2003): 16S ribosomal DNA sequence-based analysis of clinically significant gram-positive anaerobic cocci. J. Clin. Microbiol., 41:1363-1369.
 31. **Sorokulova, I., Reva, O., Smirnov, V., Pinchuk, I., Lapa, S., Urdaci, M.** (2003): Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. Letters in Applied Microbiology., 37: 169-173.
 32. **Stannard, C.** (1997): Development and use of microbiological criteria for foods. Food. Sci. Technol. Today., 11:137–177.
 33. **Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J.** (1991) : 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic study. J Bacteriology., 173:697-703.
 34. **Wenning, M., Breitenwieser, F., Konrad, R., Huber, I., Busch, U., Scherer, S.** (2014): Identification and differentiation of food-related bacteria: A comparison of FTIR spectroscopy and MALDI-TOF mass spectrometry. Journal of Microbiological Methods., (103): 44–52.

Mise au point d'une méthode d'évaluation du risque bactérien par une approche *a priori* :
Cas de la chaîne de fabrication du lait pasteurisé.

Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en sciences
Option : Microbiologie

RÉSUMÉ

L'objectif visé par cette étude est, d'une part, de mettre l'accent sur l'importance de l'adoption d'un système d'évaluation du risque microbiologique et d'autre part, d'évaluer la méthode MALDI-TOF MS en tant qu'outil efficace et rapide pour l'identification d'isolats bactériens d'origine alimentaire.

Les résultats des analyses microbiologiques, des échantillons de lait reconstitué pasteurisé prélevés à différentes étapes de leur chaîne de production, comparés aux limites de conformité indiquées dans les normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les laits et produits laitiers dérivés de la réglementation algérienne en vigueur, ont montré une conformité au niveau de la FAM. La recherche des autres germes (Coliformes totaux et fécaux, *Clostridium* sulfite-réducteurs, *Salmonella sp* et *Staphylococcus aureus*) s'est révélée négative dans ces mêmes échantillons. Cependant, une contamination par des espèces de staphylocoques à coagulase négative est détectée.

Dans cette étude, 12 bactéries isolées à partir des mêmes échantillons de laits sont identifiées par MALDI-TOF MS, confrontée à l'ADNr 16S comme méthode de référence. Nos résultats montrent une grande fiabilité de l'identification par MALDI-TOF MS au niveau de l'espèce couvrant la totalité des isolats (100%) avec un score > 2. Cette étude suggère que comparativement au séquençage du gène de l'ADNr 16S qui fournit des résultats limités; le MALDI-TOF MS et l'analyse bioinformatique peuvent être utilisés pour une identification rapide et précise des agents d'altération et de pathogènes dans l'industrie laitière. Ces outils une fois intégrés à la mise en œuvre de systèmes préventifs tels que le système HACCP, améliorera sensiblement la sécurité alimentaire.

Mots clés : MALDI-TOF MS, ADNr 16S, lait reconstitué pasteurisé, Qualité hygiénique, HACCP, pathogènes.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire - UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury :	Pr. BOUDEMAGH Allaoueddine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Rapporteur :	Pr. HAMIDECHI M. Abdelhafid	Univ. Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	Pr. RIBA Amar	Univ. M'Hamed Bougara Boumerdes
	Pr. ARHAB Rabah	Univ. Larbi BENMHIDI O.E.B
	Pr. BENHIZIA Yacine	Univ. Frères Mentouri Constantine 1

Date de soutenance : 16 Juillet 2019