

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Microbiologie

## Mémoire de Fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'Etat

Discipline: Sciences de la Nature et de la Vie

Option: Génie Biologique

### Thème

Application de trois méthodes d'analyse (Méthode classique, Test à la résazurine, Cytométrie en flux) au contrôle de conformité du lait UHT produit par Tchinalait/Candia de Bejaïa

Présenté par :

M<sup>elle</sup> AINSERI Sonia

M<sup>elle</sup> ALLOU Zahra

Membres de jury:

Président: M<sup>me</sup> FARADJI S.

Promoteur: M<sup>r</sup> SADOON B.

Examinatrice: M<sup>elle</sup> TITTELI F.

2011/ 2012

# ❧ Remerciements ❧

❧ Louanges à *ALLAH* le clément, le tout puissant qui nous a procuré la patience, la force et le courage d'aller au bout de notre objectif.

❧ Nos vifs remerciements à notre promoteur, *Mr SADOUN*, pour nous avoir encadrées, en nous faisant bénéficier de ses connaissances, de son aide et de ses conseils et orientations.

❧ Nous tenons à remercier chaleureusement les membres de jury *M<sup>me</sup> FARADJI* et *M<sup>lle</sup> TITTELI* qui nous ont fait l'honneur d'examiner ce modeste travail.

❧ En guise de respect et de gratitude, nous tenons à exprimer nos remerciements à l'organisme d'accueil *Tchin-Lait/Candia*, et à son PDG *Mr BERKATI*, pour nous avoir fait le grand honneur de nous accepter comme stagiaires au sein de son entreprise

❧ Nos vifs remerciements à *Mr ATROUCHE*, Directeur du laboratoire qui nous a permis de Réaliser cette étude sur site, à *M<sup>me</sup> ZIANE*, chef de service de laboratoire microbiologie pour ses orientations et sa gentillesse tout au long du stage.

❧ Un remerciement particulier pour tout le personnel du laboratoire surtout *M<sup>me</sup> CHERFI*, *M<sup>me</sup> AMRANI*, *Mr BELKACI* et *Mr BOUHLOUL* pour la gentillesse l'aide et leurs précieux conseils, un grand merci pour vous tous.

❧ Enfin, nos remerciements s'adressent à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

# Dédicace

*En ce moment chaleureux dans ma vie, je tiens à remercier tout  
d'abord le BON DIEU le tout*

*Puissant qui a procuré du courage et de la volonté pour mener à  
réaliser*

*Ce modeste travail que je dédie :*

*A la mémoire de mes grands parents qu'ALLAH ait pitié de son  
âme et les accueille dans son vaste paradis*

*A mes très chers parents, symbole de reconnaissance et de remerciement  
sur tout ce qu'ils m'ont donné dans ma vie et auxquels*

*Je ne pourrais leur rendre assez*

*A mes très chers(es) frère et sœurs DJAHID, ABLA, MELAZ,  
NADJATTE ET CYLIA.*

*A mes grands mères, mes oncles et mes tantes*

*A mes cousins et cousines*

*A ma meilleure copine et amie SALIMA*

*A toutes mes amies surtout RABIAA, ADJA, NABILA*

*A tous ce qui me connaissent sans oublier la promotion Génie  
Biologique 2011/2012 ainsi qu'a tous mes enseignants.*

SONIA

# Dédicaces

*A mon cher père qui a été toujours un exemple pour moi, et qui a veillé à ma réussite en déployant tous les efforts nécessaires.*

*A ma chère maman qui m'a appris à être une femme et qui m'a toujours soutenu dans mes études, je la remercie pour sa confiance et l'amour qu'elle m'a toujours accordé, ses sacrifices et son dévouement à réussir notre éducation.*

*A mes frères : Samir et Salah.*

*A mes sœurs : Ghania, Fatima, Hafida.*

*A mes beaux-frères : Hakim et Karim.*

*A mes belles-sœurs : Zakia et Nassima.*

*A tous (es) mes amis (es) et surtout : Wahida, Fatima, Siham, Lina, Dalila, Mounnira, Hana, Samia Mhand, Djalloul, Hichem, Younes.*

*A toute la promotion génie biologique 2011-2012*

*A tous ceux que j'aime, à tous ceux qui m'aime-je dédie ce modeste travail.*

*Zahra*

## Liste des Abréviations

**AFNOR** : Association Française de **NOR**malisation

**BCPL** : Bouillon Lactosé au **Pourpre** de **Bromocrésol**

**BLBVB** : Bouillon Lactosé **Bilié** au **Vert Brillant**

**CF** : Coliformes **Fécaux**

**CMF** : Cytométrie en **Flux**

**CSR** : Clostridium Sulfito-**Réducteurs**

**CT** : Coliformes **Totaux**

**D/C**: **Double Concentration**

**DLC** : **Date Limite de Consommation**

**DPCC** : **Diluant Pour Contre Colorant**

**EST**: **Extrait Sec Total**

**FAO**: **Food and Agricultural Organization**

**FTAM**: **Flore Totale Aérobie Mésophile**

**HTST**: **High Temperature Short Time**

**JORA**: **Journal Officiel de la République Algérienne**

**LR** : **Liquide de Ringer**

**MG** : **Matière Grasse**

**MGLA** : **Matière Grasse Laitière Anhydre**

**NEP** : **Nettoyage En Place**

**NIA** : **Nettoyage Intermédiaire Aseptique**

**NPP** : **Nombre le Plus Probable**

**OMS** : **O**rganisation **M**ondiale de la **S**anté

**ONIL** : **O**ffice **N**ational **I**nterprofessionnel du **l**ait

**PAE** : **P**rélèvement **A**utomatique d'**E**chantillon

**PCA** : **P**late **C**ount **A**gar

**PMT** : **P**hoto**M**ul**T**iplicateur

**SARL** : **S**ociété **A** **R**esponsabilité **L**imitée

**S/C** : **S**imple **C**oncentration

**TBA** : **T**étra **B**rique **A**septique

**TR** : **T**ank de **R**econstitution

**TS** : **T**ank **S**térile

**TT** : **T**ank **T**ampon

**UFC** : **U**nité **F**ormant **C**olonie

**UHT** : **U**ltra **H**aute **T**empérature

**UV** : **U**ltra **V**iolet

**VF** : **V**iande de **F**oie

**VRBL** : **G**élose **L**actosée **B**iliée au cristal **V**iolet et au **R**ouge neutre

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>I</b>	Composition chimique moyenne du lait.	<b>04</b>
<b>II</b>	Composition chimique moyenne du lait UHT.	<b>07</b>
<b>III</b>	Caractéristiques des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie.	<b>19</b>
<b>IV</b>	Les différents produits fabriqués par Tchik lait/Candia.	<b>23</b>
<b>VI</b>	Méthodes de dénombrement de germes dans la poudre de lait.	<b>32</b>
<b>VIII</b>	Analyses microbiologiques effectuées sur l'eau de ville et l'eau de reconstitution.	<b>33</b>
<b>IX</b>	Méthodes de dénombrement de germes dans le lait pasteurisé.	<b>34</b>
<b>XVIII</b>	Synthèse des différences notées entre les trois méthodes d'analyses.	<b>46</b>

## Liste des tableaux en annexe

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Annexes</b>
<b>V</b>	Tableau de Mac Grady de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP.	<b>V</b>
<b>VII</b>	Tableau de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP.	<b>V</b>
<b>X</b>	Mélange réactionnel à mettre en œuvre en fonction du nombre de test à réaliser.	<b>VII</b>
<b>XI</b>	Résultats d'analyses microbiologiques des poudres de lait (à 0 et 26% de MG).	<b>VIII</b>
<b>XII</b>	Résultats d'analyses microbiologiques de l'eau de ville et de l'eau de process.	<b>VIII</b>
<b>XIII</b>	Résultats d'analyses microbiologiques de lait pasteurisé.	<b>VIII</b>
<b>XIV</b>	Résultats de dénombrements de la FTAM dans le lait pasteurisé et le lait stérilisé.	<b>VIII</b>
<b>XV</b>	Résultats d'analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini.	<b>VIII</b>
<b>XVI</b>	Résultats d'analyses effectuées par le test à la résazurine.	<b>VIII</b>
<b>XVII</b>	Résultats d'analyses effectuées par la cytométrie en flux.	<b>VIII</b>

## Liste des figures

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>03</b>	Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT demi écrémé.	<b>27</b>
<b>08</b>	Analyse effectuée sur le produit fini par la méthode classique.	<b>35</b>
<b>09</b>	Analyse effectuée sur le produit fini par le test à la résazurine.	<b>36</b>
<b>11</b>	Analyse effectuée sur le produit fini par la cytométrie en flux.	<b>38</b>
<b>14</b>	Représentation graphique des résultats d'analyses effectuées sur la poudre de lait.	<b>40</b>
<b>15</b>	Résultats d'analyses du lait pasteurisé.	<b>42</b>
<b>16</b>	Résultats d'analyses du lait pasteurisé et lait stérilisé.	<b>43</b>

## Liste des figures en annexe

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Annexe</b>
<b>01</b>	Principe de la cytométrie en flux.	<b>I</b>
<b>02</b>	Organigramme de l'unité Tchén lait/ Candia.	<b>II</b>
<b>04</b>	Analyses effectuées sur la poudre de lait.	<b>VI</b>
<b>05</b>	Analyses effectuées sur l'eau de ville.	<b>VI</b>
<b>06</b>	Analyses effectuées sur l'eau de process.	<b>VI</b>
<b>07</b>	Analyses effectuées sur le lait pasteurisé.	<b>VI</b>
<b>10</b>	Cytomètre Beckman Coulter de type FC 500.	<b>III</b>
<b>12</b>	Nettoyage du matin.	<b>VII</b>
<b>13</b>	Nettoyage du soir.	<b>VII</b>

# *INTRODUCCION*

*SYNTHESE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*

# *PARTIE PRATIQUE*

# *CONCLUSION*

*REFERENCES*

*BIBLIOGRAPHIQUES*

# *ANNEXES*

**SOMMAIRE**

**INTRODUCTION** .....01

**SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

**I.GENERALITES SUR LE LAIT**

I.1. Définition .....03

I.2. Aspect et composition .....03

I.3. Flores microbiennes .....04

I.3.1. Flores indigènes ou originelles .....04

I.3.2. Flores de contamination .....04

I. 4. Germes recherchés .....05

I.5. Procédés de conservation .....05

I.5.1. Par le froid .....05

I.5.2.Par la chaleur .....06

**II. TECHNOLOGIE DU LAIT UHT**

II.1. Définition.....07

II.2. Composition .....07

II.3. Normes requises pour les laits stérilisés.....08

II.4. Différents systèmes de chauffage.....08

II.5. Reconstitution et recombinaison du lait.....09

II.6.Matières premières utilisées.....09

II.7. Traitements thermiques .....11

II.8. Influence du traitement thermique sur la valeur nutritionnelle du lait UHT.....12

II.9. Avantages et inconvénients de la stérilisation UHT.....13

**III. METHODES DE VERIFICATION DE LA STERILITE DU LAIT UHT  
DEMI ECREME**

III.1. Méthode classique .....	15
III.1.1. Principe.....	15
III.1.2. Avantages et inconvénients .....	16
III.2. Méthode de réduction (Test à la résazurine) .....	16
III.2.1.Principe.....	16
III.2.2. Avantages et limites.....	17
III.3. Cytométrie en flux.....	17
III.3.1. Définition .....	17
III.3.2. Principe de fonctionnement.....	17
III.3.3. Composants d'un cytomètre.....	18
III.3.4. Fluorochromes utilisés.....	19
III.3.4.1. Définition.....	19
III.3.4.2. Principaux fluorochromes utilisés.....	19
III.3.5. Applications.....	20
III.3.6. Avantages et inconvénients.....	20

## **PARTIE PRATIQUE**

### **I. PRESENTATION DE L'ORGANISME D'ACCUEIL : LAITERIE TCHIN-LAIT / CANDIA**

I.1. Organisation .....	22
I.2. Les différents produits fabriqués .....	23

### **II. PROCESSUS TECHNOLOGIQUE DU LAIT UHT DEMI ECREME**

II.1. Reconstitution.....	24
II.2.Pasteurisation .....	24
II.2.1. Préchauffage.....	24
II.2.2. Dégazage.....	25
II.2.3. Homogénéisation.....	25

II.2.4. Pasteurisation HTST.....	25
II.3. Stérilisation UHT.....	25
II.3.1. Préchauffage.....	25
II.3.2. Homogénéisation.....	25
II.3.3. Stérilisation UHT proprement dite.....	26
II.4. Conditionnement aseptique.....	26
II.5. Nettoyage et désinfection.....	28
<b>III. MATERIELS ET METHODES</b>	
III.1. Mode de prélèvement et méthodes d'analyses.....	29
III.1.1. Mode de prélèvement et d'échantillonnage.....	29
III.1.2. Méthodes d'analyses.....	31
III.1.2.1. Méthode classique.....	31
III.1.2. 2. Test à la résazurine.....	35
III.1.2.3. Cytométrie en flux.....	37
<b>III. RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
III.1. Qualité des matières premières.....	40
III.2. Qualité du lait pasteurisé.....	41
III. 3. Comparaison des résultats obtenus lors de la pasteurisation et de la stérilisation.....	42
III.4. Qualité du lait UHT demi écrémé.....	43
III.4.1. Par la méthode classique.....	43
III.4.2. Par le test à la résazurine.....	44
III.4.3. Par la cytométrie en flux.....	44
III.5. Comparaison entre les trois méthodes d'analyse.....	45
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

### **Introduction**

En Algérie, le lait joue un rôle important dans la ration alimentaire de chaque individu indépendamment du revenu (**Mokhtari, 2009**).

La demande du consommateur s'oriente de plus en plus vers des produits innovants et à la qualité constante. Ainsi, l'industrie doit exploiter toutes les richesses de cet aliment à la fois si simple en apparence et si complexe dans sa composition (**Pougheon, 2001**).

Le lait doit être produit et maintenu en état d'hygiène. Cette règle essentielle est très difficile à respecter dans les pays en voie de développement du fait des conditions climatiques défavorables et du manque d'installations adéquates (**Aggad et al., 2010**).

La production laitière dans les pays du Maghreb n'est pas régulière au cours de toute l'année. Ainsi, l'instauration et le développement de méthodes de conservation du lait sont impératifs, notamment pour ces pays, suite au progrès scientifique qu'a connu le domaine de l'agroalimentaire qui a intégré des procédés industriels permettant de produire plus et mieux, et répondant de cette manière à un marché qui devient plus exigeant (**Abdenouri et al., 2008**).

La filière lait en Algérie se trouve dans une phase critique, face à une production locale insuffisante, aggravée par un taux de collecte très faible et une augmentation des prix des matières premières sur les marchés internationaux. Selon les estimations de l'Office national interprofessionnel du lait (ONIL), l'Algérie importe en moyenne pour 40 milliards de dinars de poudre de lait chaque année et la collecte du lait cru a atteint en 2011 près de 500 millions de litres, sans noter que l'objectif est d'arriver à 700 millions de litres en 2012 (**Belhadia et al., 2009 ; Liberté, 2012**).

Les différents procédés industriels appliqués au lait visent à assurer la qualité et la stabilité des produits. De ces procédés, les traitements de chaleur par la pasteurisation et la stérilisation à ultra haute température sont très utilisés en technologie laitière. L'aptitude du lait à supporter les hautes températures est une caractéristique technologique importante (**Robitaille, 1995**).

Pour que les résultats des contrôles effectués soient fiables, les analyses microbiologiques doivent être réalisées à l'aide de techniques performantes à différents niveaux, dotées de spécificité, exactitude, précision et praticabilité (**Guiraud et Rosec, 2004**).

La laiterie Tchir-lait /Candia a donc mis en place une politique qualité en adoptant de nouvelles techniques telles que la résazurine (en 2001) et la cytométrie en flux (en 2006) qui ont permis au cours de ces dernières années, d'acquérir une meilleure maîtrise des caractéristiques microbiologiques et physicochimiques du lait UHT produit.

La présente étude a pour objectif d'évaluer la qualité microbiologique du lait produit, tout au long du processus de fabrication par trois méthodes d'analyse : méthode bactériologique classique, méthode de réduction de colorant (résazurine) et par la cytométrie en flux. Les résultats obtenus de vérification de la stérilité du lait UHT demi-écrémé vont nous permettre d'effectuer la comparaison entre ces méthodes. Cela permettra aussi l'amélioration du contrôle microbiologique du lait et éventuellement l'utilisation des méthodes rapides afin de pouvoir libérer le produit dans les plus brefs délais et éliminer ainsi les aspects hygiéniques identifiés comme facteurs de risque pour les consommateurs.

## **I. Généralités sur le lait**

### **I.1. Définition**

Le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini en 1909 par le Congrès international de la Répression des Fraudes comme suit : « Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie, et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum» (**Veisseyre, 1975**).

Aliment nutritif pour les êtres humains, le lait constitue un milieu propice pour la croissance de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries pathogènes (**Chye et al., 2004**).

C'est un aliment de base pour l'homme, indispensable pour le nouveau-né, il s'avère très bénéfique pour l'adulte (**Steijns, 2008**).

La dénomination du lait sans indication de l'espèce animale de provenance, est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle autre que la vache doit être désigné par la dénomination « lait » suivi de l'indication de l'espèce animale dont il provient (**Leseur et Melik, 1985; JORA N° 69, 1993**).

### **I.2. Aspect et composition**

Le lait apparaît comme un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$ -carotène de la matière grasse. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable. Le lait est caractérisé par différentes phases en équilibre instables :

- Une phase aqueuse contenant en solution des molécules de sucre, des ions et des composés azotés ;
- Des phases colloïdales instables, constituées de deux types de colloïdes protéiques
- Des globules gras en émulsion dans la phase aqueuse (**Mathieu, 1998**).

Les principaux constituants du lait sont l'eau, la matière grasse, les protéines, le lactose (sucre de lait) et les minéraux (sels). Le lait contient également des traces d'autres substances, tels que les pigments, enzymes, vitamines, phospholipides et les gaz dissous (**Amiot et al., 2002**).

La composition chimique moyenne du lait est indiquée dans le tableau I.

Tableau I: Composition chimique moyenne du lait (Eck, 1975).

Constituants	Teneurs (g /Kg)
Eau	900 à 910
EST	125 à 130
Matière grasse	35 à 45
Lactose	47 à 52
Matières azotées :	
Caséine et albumine	32 à 35
Matière minérale	7.5 à 8.5

### I.3. Flores microbiennes

#### I.3.1. Flores indigènes ou originelles

La flore microbienne du lait cru est très diversifiée. Selon son intérêt on peut la scinder en :

- Microorganismes utiles ou à intérêt technologique : lactocoques, lactobacilles, leuconostocs, flore de surface tel que levures, microcoques (**Berodier et al., 2005; Beuvier et Feutry, 2005**).
- Microorganismes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire :
  - Il peut s'agir d'agents de mammites : Streptocoques pyogènes, Corynébactéries pyogènes, Staphylocoques, et des entérobactéries notamment *E. coli*, *Klebsiella sp* (**Gabli, 2005**).
  - Il peut s'agir aussi d'agents d'infection générale : *Salmonella* ; *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobactérium*, *Bacillus anthraci*, *Coxiella burnettii*, et quelques virus).
- Les germes banaux du pis ne présentent pas de danger sanitaire mais peuvent se développer abondamment dans le lait. Les autres peuvent être responsables de maladies ou d'intoxications graves, qui sont généralement limités par la surveillance vétérinaire des animaux producteurs (**Guiraud, 2003**).

#### I.3.2. Flores de contamination

Le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- **Fèces et téguments de l'animal** : Coliformes, Entérocoques, Clostridium, éventuellement Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc.
- **Sol** : Streptomyces, Listeria, bactéries sporulées, spores fongiques.
- **Laitières et aliments** : flore banale variée, en particulier *Lactobacillus*, *Clostridium butyricum*.
- **Air et eau** : flores diverses dont Pseudomonas, bactéries sporulées.
- **Équipement de traite et de stockage du lait** : Microcoques, levures et flores lactiques avec Lactobacilles, Streptocoques (*Streptococcus*), *Lactococcus*, *Enterococcus*, Leuconostoc, etc.
- **Manipulateurs** : Staphylocoques dans le cas de traite manuelle et germes provenant de contamination fécale.
- **Vecteurs divers (insectes en particulier)** : des microorganismes inoffensifs, d'autres dangereux du point de vue sanitaire, d'autres capables d'entraîner la détérioration du lait (**Guiraud, 2003**).

**I.4. Germes recherchés** : selon (**JORA N° 35, 1998**), les germes recherchés dans le lait sont :

- Germes aérobies à 30°C
- Coliformes fécaux
- Streptocoques fécaux
- *Staphylococcus aureus*
- Clostridium sulfito- réducteurs à 46 °C
- Antibiotiques

### **I.5. Procédés de conservation**

L'industrie laitière recherche en permanence de nouvelles techniques de conservation du lait avec comme objectif d'obtenir un lait qui se conserve longtemps sans en altérer les qualités nutritionnelles et organoleptiques (**Lortal et Delage, 2008**).

Pour assurer la conservation et l'assainissement du lait, la technologie fait appel à divers procédés, on peut citer:

#### **I.5.1. Par le froid**

Actuellement, le froid est un moyen très pratique pour conserver les aliments, tout en préservant leurs qualités nutritionnelles et organoleptiques.

**a. Réfrigération**

La réfrigération est une technique de semi conservation, et consiste à placer les denrées dans une enceinte maintenue vers +5°C. Cette température freine le développement des germes mésophiles. Par contre, le traitement est sans effet sur les psychrophiles, qui se développent à la température de réfrigération (**Gosta ,1995**).

**b. Congélation**

C'est un procédé physique qui a pour but la conservation prolongée par le froid. Les produits alimentaires sont conservés à -40°C, il est très important que le lait destiné à être conservé par le froid, soit de bonne qualité hygiénique.

Le but de l'emploi du froid est souvent d'inhiber, retarder ou arrêter d'une part les réactions enzymatiques dans le produit alimentaire et d'autre part la croissance des microorganismes.

En résumé, le froid constitue un moyen important de conservation du lait (**Gosta, 1995**).

**I.5.2.Par la chaleur**

Contrairement à l'action du froid, la chaleur permet de détruire les microbes et non d'inhiber simplement leur développement. D'autre part elle vise à détruire les enzymes qui peuvent impliquer la détérioration du lait. Ce qui permet l'amélioration de la qualité du lait.

**a. Pasteurisation**

C'est un processus de traitement thermique qui vise à détruire certains microorganismes présents dans le produit. Ce processus consiste à chauffer l'aliment jusqu'à une certaine température, souvent inférieure à 100°C. Elle est employée pour les aliments qui nécessitent uniquement la destruction des germes pathogènes ou toxigènes.

**b. Stérilisation**

Elle vise à la destruction totale des microorganismes et des spores présents dans le produit. La stérilisation consiste à chauffer le produit alimentaire au-delà de 100°C pour lui assurer une conservation prolongée (**Veissyre, 1979**).

Pour cette raison, le traitement de « stérilisation » vise, en pratique à obtenir un produit restant stable au cours d'une longue conservation (de 5à6 mois).

**II. Technologie du lait UHT****II.1. Définition****II.1.1. Lait UHT**

Il est soumis à un traitement thermique (140-150°C) pendant 3 à 4 secondes. Ce traitement permet de préserver les qualités nutritionnelles et organoleptiques du lait mais aussi la destruction ou l'inhibition partielle des enzymes, des microorganismes et de leurs toxines (JORA N°80, 1999 ; Mahaut *et al.*, 2000; Jeantet *et al.*, 2008).

**II.1.2. Lait UHT demi écrémé**

Lait stérilisé et lait stérilisé UHT demi écrémé : leur teneur en matières grasses est de 1,5 à 2% (15 grammes à 20 grammes par litre de matières grasses) (JORA N°69, 1993).

**II.2. Composition**

La composition chimique moyenne est rapportée dans le tableau II.

**Tableau II** : Composition chimique moyenne du lait UHT (Feinberg *et al.*, 1987).

<b>Constituants</b>	<b>Lait UHT entier (g/kg)</b>	<b>Lait UHT demi écrémé (g/kg)</b>	<b>Lait UHT écrémé (g/kg)</b>
Eau	878	896	910
Matière sèches	122	104	90
Azote total	5	5	5,2
Protéines	31,9	31,9	32,9
Lipides totaux	35,4	15,5	2
Glucides disponibles	44,7	45,3	45,4

### **II.3. Normes requises pour les laits stérilisés**

Le but principal de l'établissement des normes microbiologiques est de protéger la santé des consommateurs. Elles sont également utiles pour l'application des lois et règlements concernant le contrôle des aliments; ainsi que lors d'échanges commerciaux entre pays (**Semasaka, 1986**).

Selon l'article 27 de l'arrêté de 18 Août 1993; les laits stérilisés et stérilisés UHT :

1. Doivent rester stables jusqu'à leur date limite de consommation.

En outre, ils ne doivent pas :

2. Présenter de défauts organoleptiques tels que la protéolyse et les anomalies de goût ou d'odeur;

3. Coaguler, précipiter ou flocculer à l'ébullition;

3. Présenter une acidité titrable supérieure à 1,8 grammes par litre d'acide lactique;

4. Avoir une variation de pH supérieure à 0,2 unité, du fait de l'incubation;

5. Contenir un nombre de micro-organismes aérobies à 30° C supérieur à 10 par 0,1 millilitre.

### **II.4. Différents systèmes de chauffage**

Les procédés de traitement UHT mettent en œuvre deux systèmes de chauffage ; direct et indirect ;

#### **II.4.1. Chauffage indirect**

Dans les méthodes par chauffage indirect, une surface d'échange thermique sépare le lait du fluide chauffant. Les appareils utilisés sont généralement des appareils à plaques ou à tubes. Notons toutefois que dans les appareils à chauffage indirect la transmission de chaleur s'effectue plus lentement que lors du contact direct entre les deux fluides. Il en résulte nécessairement un allongement du temps de stérilisation. On utilise couramment une température de 135° C à 140° C maintenue pendant 3 à 15 secondes (**Gandon et al., 1974; Jeantet et al., 2007**).

**II.4.2. Chauffage direct**

Dans les systèmes directs, on distingue entre le « système d'injection de la vapeur », dans lequel la vapeur est injectée directement dans le lait (Injection de la vapeur dans le lait) et le « système d'infusion de la vapeur » (infusion de la vapeur dans le lait). Dans ce système, le lait est pulvérisé dans un « infuseur » (répartition des gouttelettes). La température de chauffage (température UHT) s'élève dans les deux systèmes à environ 150 °C. Le lait séjourne dans un chambreur tubulaire pendant environ 2 secondes (**Strahm et Eberhard, 2009**).

**II.5. Reconstitution et recombinaison du lait****a) Reconstitution**

La reconstitution est un mélange d'eau et de lait en poudre en vue de rétablir: un rapport eau/matière sèche du produit initial.

**b) Recombinaison**

- La recombinaison est un mélange de lait reconstitué et de matière grasse de lait anhydre (MGLA) en vue d'obtenir un produit dont les caractéristiques ressemblent au lait de vache.
- Le mélange matière grasse et lait reconstitué subit une homogénéisation à une température de 60 - 65°C afin d'éviter la remontée de la matière grasse dans le produit (**Boularak, 2005**).

**II.6. Matières premières utilisées****II.6.1. Poudre de lait**

La poudre de lait est constituée de lait déshydraté. Il a l'avantage de se conserver plus longtemps que le lait liquide, et n'a pas besoin d'être stocké en réfrigérateur. C'est le produit solide obtenu directement par l'élimination de l'eau du lait, il est de couleur blanchâtre légèrement crème homogène ne contient pas d'impuretés.

Elle est obtenue par séchage quasi-total de lait liquide. Elle a une humidité résiduelle de 2,5 à 4%. Un pourcentage si bas d'eau élimine tous les risques de formation bactériennes et assure au lait en poudre une meilleure conservation pour de longues périodes jusqu'à un an à température ambiante (**Michel et al., 2002**).

En effet, le procédé SPRAY (basse température) donne une poudre de meilleure qualité commerciale que le procédé HATMAKER (haute température), mais peut exposer au risque de contamination (**Semazaka, 1986**).

On distingue les laits en poudre suivants:

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.
- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses (**Beisson et Martinez, 2009**).

### **II.6.2. Eau de process**

Elle doit être potable et notamment répondre aux standards fixés par l'organisation mondiale de la santé. Sur le plan microbiologique, elle ne doit contenir aucun germe pathogène. Leur recherche nécessite des techniques spéciales, on choisit comme indicateur de pollution des germes de contamination fécale qui sont plus faciles à identifier, à dénombrer et les plus communs (bactéries coliformes, dont *Escherichia coli*, *streptocoques* fécaux, *Clostridium* sulfite réducteurs).

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°F et un pH voisin de la neutralité (**Larpen, 1996**).

### **II.6.3. Matière Grasse Laitière Anhydre (MGLA)**

L'état de la matière grasse dans les poudres est un facteur très important permettant l'appréciation de la qualité ; il faut éviter toute altération des globules gras conduisant à une libération de graisses libres. Après la reconstitution celles-ci forment un film d'huile à la surface du lait. D'autre part, leur présence accroît les risques d'oxydation (**Veisseyre, 1975**).

La matière grasse laitière anhydre est le produit obtenu, exclusivement, à partir de lait, de beurre ou de crème au moyen de procédés entraînant l'élimination quasi-totale de l'eau et de l'extrait sec non gras.

Elle contient au maximum 0,1% d'eau.

Elle doit être utilisée, exclusivement, par les industries alimentaires, pour la préparation des produits devant subir une cuisson ou tout autre traitement thermique (**JORA N°80, 1999**).

## **II.7.Traitements thermiques**

L'objectif principal du traitement thermique est de tuer par la chaleur tous les agents pathogènes éventuellement présents dans le lait afin d'éviter une mise en danger de la santé des consommateurs.

### **II.7.1.Pasteurisation**

La pasteurisation est le processus de chauffage qui se fait à une température inférieure à 100°C, dont le but est de ramener le nombre de microorganismes dangereux dans le lait à un niveau tel qu'il ne présente plus de danger pour la santé (**Codex alimentarius, 2000 ; Bazinet et al., 2002**).

### **II.7.2. Stérilisation**

#### **II.7.2.1. Stérilisation simple**

La technique de ce type de stérilisation consiste à porter le lait à une température de 115°C pendant 15 à 20 minutes, il est ensuite conditionné dans un emballage hermétique.

#### **II.7.2.2. Stérilisation UHT**

Le procédé dit d'ultra haute température est également un procédé de longue conservation qui permet d'écourter le temps de chauffage.

C'est le chauffage en écoulement continu au dessus de 135°C pendant 2 à 4 secondes, puis de le conditionner dans une ambiance stérile.

Il a l'avantage de détruire rapidement les microorganismes tout en minimisant la modification des constituants du lait. Ses qualités gustatives sont mieux préservées qu'avec la stérilisation simple.

Le lait UHT peut être entier, demi-écrémé ou écrémé. On le trouve dans le commerce sous le nom « lait stérilisé UHT ». Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert (**Odet, 1985; Beisson et Martinez, 2009**).

## **II.8. Influence des traitements thermiques sur la valeur nutritionnelle du lait**

Tous les constituants du lait (protéines, matière grasse, lactose minéraux et vitamines) ne se retrouvent pas entièrement sous forme native selon les traitements appliqués. Les traitements mis en œuvre ne sont jamais inoffensifs ; ils entraînent toujours une perte de valeur nutritionnelle (**Romain et al., 2008**).

### **II.8.1. Sur les protéines**

Il faut tenir compte de l'effet de la chaleur sur les protéines dans la majorité des traitements thermiques du lait. Le chauffage d'un lait provoque des changements dans la structure, principalement la dénaturation des protéines du lactosérum (lactalbumines, et les lactoglobulines et les immunoglobulines) et l'interaction de ces dernières avec les micelles des caséines.

Cette dénaturation entraîne les phénomènes : la coagulation qui se manifeste par une perte de solubilité, et l'hydratation puisque la structure tertiaire de la protéine est étirée.

De plus, il est important de noter que lors du chauffage du lait à une température de 90°C, la  $\beta$ -lactoglobuline se dénature et se fixe à la micelle de caséine par un pont disulfure (-s-s-). Cette fixation a pour effet d'augmenter le volume des micelles des caséines et d'augmenter la viscosité des produits laitiers (**Amiot et al., 2002 ; Lacroix et al., 2008**).

### **II.8.2. Sur la matière grasse**

Le chauffage (la pasteurisation courte ou instantanée, la stérilisation ou le processus UHT) ne semble pas modifier la qualité des graisses. Il faut atteindre des températures nettement supérieures à 100°C ou des durées prolongées pendant plusieurs heures à 70°C - 80°C pour enregistrer une dégradation des glycérides se traduisant par la formation de gamma- lactone et de méthyle cétones, ces produits de dégradation ont des saveurs marquées à très faibles doses. Ils sont à l'origine de certains défauts tels que la saveur caractéristique du lait en poudre reconstitué (**Veisseyre, 1979; FAO, 1998**).

**II.8.3. Sur les acides aminés**

Le chauffage accélère la réaction de Maillard : il se forme un complexe entre la lysine et le lactose (sucre réducteur) appelé composé d'Amadori qui se décompose en acide levulique et formique. Ces molécules ont la propriété d'activer la croissance des bactéries lactiques (cas du yaourt et des fromages frais). Parallèlement, il ya apparition d'un goût de cuit et de brunissement (**Romain et al .,2008**).

**II.8.4.Sur les enzymes**

Quant aux enzymes, il convient de distinguer celles dites originelles, c'est-à-dire celles qui se trouvent dans le lait dès la traite, de celles qui y sont apportées par les bactéries qui s'y sont développées.

Ainsi parmi les enzymes originelles, on trouve une lipase (détruite par la pasteurisation), une galactase, une lactase, des phosphatases (détruites également par la pasteurisation), une réductase, une catalase et une peroxydase. La sensibilité de la phosphatase alcaline aux actions thermiques sert d'indice d'efficacité de la méthode appliquée. En effet, il a été démontré qu'à une réaction de phosphatase négative correspond une destruction des germes pathogènes que le lait peut véhiculer (**Eck, 1975**).

**II.8.5. Sur les vitamines**

Les vitamines B1, B6, B12, C et l'acide folique sont sensibles à la chaleur. Dans le cas du procédé UHT, la réduction de ces vitamines par le procédé direct est nettement moins importante que dans le procédé indirect. La perte de vitamines se poursuit quelque peu lors de l'entreposage du lait chauffé et dépend dans ce cas de la température d'entreposage et de l'oxygène résiduel dans le lait (**Strahm et Eberhard, 2010**).

**II.9. Avantages et Inconvénients de la stérilisation UHT**

- **Avantages**

La brièveté du traitement thermique permet de limiter la perte organoleptique tout en assurant une stérilisation complète. Ce procédé offre en particulier un double avantage d'une longue conservation du lait de consommation sans besoin de réfrigération. La distribution en devient plus économique, puisqu'elle peut être étendue, sur un délai

hebdomadaire par exemple, et qu'elle n'est pas sujette à des limites de parcours (**Boisard, 1994 ; Vignola, 2002**).

- **Inconvénients**

Au cours du stockage, le lait UHT peut présenter deux types d'instabilités :

- La formation des sédiments, dont une couche est de nature protéique ;
- L'augmentation de sa viscosité au cours du temps, jusqu'à la formation éventuelle d'un gel, ces inconvénients se rencontrent lors de défauts de fabrication.

De plus les traitements UHT, ne parviennent pas à inhiber totalement les activités de protéolyse dues à des protéases extracellulaires de certaines bactéries notamment psychrotrophes. En effet, durant le stockage du lait UHT, le degré de protéolyse accroit (**Veisseyre, 1979**).

### **III. Méthodes de vérification de la stérilité du lait UHT demi écrémé**

Il est important de connaître les possibilités offertes aux services de contrôle pour vérifier si les produits examinés répondent bien aux définitions proposées d'un lait stérilisé à ultra haute température conditionné aseptiquement (**Gandon et al., 1974**).

Les méthodes d'analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans le lait afin d'en maîtriser leur présence ou absence et leur nombre (**Louis, 2007**).

Comme méthodes de contrôle pouvant être réalisées sur le produit fini avant sa commercialisation, il ya lieu de citer :

- La méthode classique (bactériologique) ;
- La méthode de réduction (test à la résazurine) ;
- La cytométrie en flux.

#### **III.1. Méthode classique**

Le lait constitue un milieu de culture et de protection pour plusieurs microorganismes, y compris les microorganismes pathogènes pour l'Homme.

L'analyse microbiologique est une étape très importante qui vise d'une part, à conserver les caractéristiques organoleptiques et sensorielles du lait, donc d'allonger sa durée de vie, et d'autre part, à prévenir les cas d'empoisonnement alimentaire lié à la présence des microorganismes pathogènes et leur transmission au consommateur (**Lamontagne et al., 2002**).

##### **III.1.1. Principe**

Elle consiste en le dénombrement de la flore totale, et elle correspond aux microorganismes aptes à donner des colonies visibles après trois jours d'incubation à 30°C sur gélose pour dénombrement (**Rouillard, 2004**).

Ce dénombrement effectué dans l'analyse type d'un aliment constitue un indicateur de la qualité sanitaire et reflète l'histoire du produit (**Louis, 2007**).

Les résultats obtenus sont comparés aux critères microbiologiques établis par des commissions de spécialistes au sein d'organismes comme l'AFNOR, OMS, FAO et le

Codex alimentarius. Ces normes et critères microbiologiques donnent en générale les limites de conformité, de même que les méthodes à utiliser (**Guiraud, 2003**).

### **III.1.2. Avantages et inconvénients**

#### **III.1.2.1. Avantages**

- Le principal avantage est sans aucun doute le prix ; Le matériel utilisé est peu onéreux, et la plus grande part du temps utilisé pour ces techniques est dédiée à attendre que les microorganismes se développent, ce qui ne nécessite aucune intervention humaine.
- pour chaque souche ou famille d'intérêt est utilisé un milieu et des conditions de croissance spécifiques ; ce qui permet de sélectionner avec autant de précision que possible le ou les micro-organismes (**Rouillard, 2004**).
- l'analyse microbiologique traditionnelle des produits finis reste encore indispensable car elle permet avec une certaine inertie d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation (**Louis, 2007**).

#### **III.1.2.2. Inconvénients**

Ils résident principalement dans :

- La faible précision du mode de détection ; malgré l'apparition d'appareils automatiques qui permettent d'étaler puis de dénombrer les colonies à la surface d'une boîte de Pétri, le meilleur dispositif reste encore le bras et l'œil humains (**Rouillard, 2004**).
- La recherche d'un groupe particulier de bactéries parmi d'autres peut être extrêmement difficile (**Joffin et Joffin, 2003**).

### **III.2. Méthode de réduction : Test à la résazurine**

Cette méthode permet d'évaluer le nombre de bactéries dans le lait. On utilise à cet effet, la résazurine dont la rapidité de décoloration est proportionnelle à l'activité des réductases bactériennes (**Beerens et Luquet, 1987**).

#### **III.2.1. Principe**

Il s'agit d'une mesure indirecte de la densité bactérienne. Les bactéries en se développant, utilisent l'oxygène dissous et abaissent le potentiel d'oxydo-réduction du milieu. La plus part des bactéries se multipliant dans le lait sont capables grâce à l'action de leur réductase, d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction jusqu'à la décoloration d'un indicateur redox. On utilise la résazurine dont la couleur varie du bleu au blanc en passant par le rose (**Plusquellec, 1991**).

### **III.2.2. Avantages et limites**

- Elle est largement utilisée dans les tests biologiques due à la facilité de réduction de la résazurine à la Résorufine (**Carlos, 2011**).
- C'est une évaluation indirecte qui a l'avantage d'être rapide, simple, économique, et réalisée sur des volumes importants (**Plusquellec, 1991**).
- Certaines substances inhibitrices telles que la pénicilline et autres antibiotiques peuvent inhiber la croissance de certaines bactéries et donc augmenter le temps de la réduction (**Vishweshwar et al., 2005**).
- Ce type de méthode ne s'applique qu'à des laits n'ayant pas subi de réfrigération du fait que la basse température prolonge considérablement la durée de réduction des colorants (**Beerens et Luquet, 1987**).

Les méthodes rapides (test à la résazurine en 10 min) pratiquée par certaines laiteries ne sont pas valables et conduisent à sous estimer la flore (**Guiraud et Galzy, 1980**).

### **III.3. Cytométrie en flux**

L'utilisation des propriétés cellulaires intrinsèques (diffusion, auto fluorescence) et le développement permanent de fluorochromes capables de traduire de nombreuses propriétés et fonctions cellulaires ont conduit à la mise en œuvre de méthodes de plus en plus fines pour l'analyse de populations de cellules hétérogènes comme la cytométrie en flux (**Lehman, 2011**).

#### **III. 3.1. Définition**

La cytométrie en flux est un outil qui permet de caractériser les éléments d'une suspension cellulaire et / ou particulaire mono dispersés entrainés par un flux liquide sous pression (**Rosenzwajg, 2009**).

#### **III.3.2.Principe de fonctionnement**

Avant toute analyse, les cellules doivent se mettre sous forme d'une suspension marquée à l'aide de fluorochromes spécifiques (intercalant...), ou par immunomarquage fluorescent (anticorps marqués) (**El Khoury, 2006**).

Les cellules sont ensuite injectées au centre d'une veine liquide indépendante (le liquide de gaine) (**Greimers, 2002**).

La différence de pression qui est exercée sur la veine liquide et sur la préparation cellulaire permet de positionner les cellules l'une derrière l'autre pour être analysées séparément (**Branger et al., 2007**).

Elles passent ensuite dans un faisceau lumineux focalisé sur le centre du jet et généralement fourni par un laser. L'interaction entre le faisceau et les particules est à l'origine de signaux lumineux, lesquels sont séparés et sélectionnés par un jeu de miroirs et de filtres puis collectés par des photo détecteurs (photodiodes et photomultiplicateurs) qui vont les transformer de façon proportionnelle en signaux électriques.

Enfin, l'analyseur multicanaux va permettre le traitement des signaux électriques afin d'obtenir un histogramme de la répartition de la population analysée, en fonction du ou des paramètres étudiés (**El Khoury, 2006**).

Le principe de la cytométrie en flux est résumé sur la figure n°01(Annexe I).

### **III.3.3.Composants d'un cytomètre**

Le cytomètre est une combinaison de 3 différents systèmes.

#### **1. Système fluide**

Une suspension de cellules est injectée dans la cellule de mesure où elles passent en file indienne devant un laser qui est orthogonale à l'écoulement. Ceci est basé sur le principe de focalisation hydrodynamique de l'échantillon jet ; le liquide de gaine injecté et l'échantillon s'écoulent en flux laminaire (**Rieseberg et al., 2001**).

#### **2. Système optique**

Les cellules sont illuminées par un laser; elles émettent une fluorescence qui est collectée par des lentilles, filtrée par des filtres qui permettent de sélectionner les longueurs d'ondes appropriées (**Ezzahra et E'Lfakihi, 2007**).

#### **3. Système électronique**

Il est constitué de :

- Un photomultiplicateur (PMT) capte la lumière émise.
- Un digitaliseur qui transforme l'énergie lumineuse (photons) en signaux électriques (volts) puis en signaux numériques (canaux).
- Un amplification du signal.
- Enfin, les données sont envoyées à un ordinateur qui les gère grâce à un logiciel d'analyse (Cellquest ou Diva).

### **4. Présentation des données**

Les signaux optiques recueillis ont une intensité corrélée avec des propriétés cellulaires ; ils forment des nuages de points (sur des cytogrammes) autour desquels on dessine des fenêtres électroniques. L'axe des abscisses représente l'intensité du signal analysé et l'axe des ordonnées le nombre de cellules.

Au sein de chaque fenêtre, on peut préciser la distribution de la fluorescence (**Lehman, 2011**).

### **III.3.4. Fluorochromes utilisés**

#### **III.3.4.1. Définition**

Ce sont des molécules qui ont la propriété d'absorber de l'énergie lumineuse et de la restituer, généralement avec une énergie plus basse (une longueur d'onde plus grande). Les fluorochromes les plus utilisés dans la cytométrie en flux sont ceux qui ont la propriété de se fixer sur des composants cellulaires et qui sont excitables par le laser (**Overton, 2006 ; Lehman, 2011**).

#### **III.3.4.2. Principaux fluorochromes utilisés**

Les caractéristiques des fluorochromes utilisés en cytométrie sont indiquées dans le tableau III.

**Tableau III** : Caractéristiques des principaux fluorochromes utilisés en cytométrie (**Duperray et al., 1993**).

<b>Colorant</b>	<b>Liaison/fonction</b>	<b>Longueur d'onde d'excitation (nm)</b>	<b>Longueur d'onde d'émission (nm)</b>
Chromomycine A3	ADN (bases G-C)	420	560
Iodure de propidium	ADN (intercalant)	370, 560	631
Bromure d'Ethidium	ADN (intercalant)	370,530	622
Acridine orange	ARN/ADN	492/492	527/630
Thioflavine	ARN (ADN)	422	487
Phycoérythrine R	Protéines	565	578
Allophycocyanine	Protéines	642	660

### **III.3.5. Applications**

**En hématologie :** concerne l'étude fonctionnelle de cellules saines ainsi que la mise en évidence du caractère pathologique des cellules analysées.

**En cancérologie :** la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale.

**En pharmacologie:** de nombreuses études en pharmacologie font aussi appel à des techniques de CMF : mise au point ou étude de drogues antimétabolites , immunothérapie **(Duperray et al., 1993).**

**L'étude du cycle cellulaire :** la mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux divise le cycle en trois phases : G0/G1, phase d'activation des cellules, S, phase de synthèse de l'ADN et G2/M, phase de mitose. Ces trois phases sont différentes par leur quantité d'ADN **(El Khoury, 2006).**

**D'autres recherches font appel à la CMF :** l'analyse des chromosomes , la génétique moléculaire permettent d'extraire et de quantifier les informations contenues dans des images **(Duperray et al., 1993).**

### **III.3.6. Avantages et inconvénients**

#### **III.3.6.1. Avantages**

- Cette technique permet de faire simultanément l'analyse quantitative de plusieurs paramètres sur des éléments en suspension : cellules, levures, bactéries ou constituants cellulaires (noyaux, mitochondries, chloroplastes, chromosome). Un grand nombre d'éléments peuvent être analysés ce qui apporte précision et représentativité aux résultats **(Lehman, 2011).**
- L'analyse rapide d'un grand nombre d'événements, donnant des résultats avec une meilleure signification statistique **(Bouvier et al., 2001).**
- Cette méthode réunit les cinq caractéristiques essentielles suivantes : analyse quantitative, sensibilité de détection, rapidité, analyse multiparamétrique cellule par cellule, tri et d'y combiner un compteur de fluorescence apte à quantifier l'expression de ces marqueurs **(Duperray et al., 1993 ; Delville et Pradier, 2002).**

- Cette technique à l'avantage d'automatisation de la partie la plus laborieuse du procédé, et aussi chaque bactérie passe dans le canal, et l'analyse permet en théorie d'obtenir des informations sur chaque cellule, et donc sur l'ensemble de la population, telles que la taille et la forme des bactéries (**Rouillard, 2004**).

### **III.3.6.2. Inconvénients**

- Le problème majeur de la quantimétrie est lié à l'absence de « mesure étalon » pour la fluorescence qui permettrait aux fabricants et aux utilisateurs de systèmes de quantification de standardiser.

- Un autre problème réside dans l'étude statistique des histogrammes générés par les programmes qui pilotent les cytomètre. Il n'est statistiquement pas correct de mesurer une moyenne ou une médiane de fluorescence sur des histogrammes présentant plusieurs pics de fluorescence, ou une distribution non log-normal (**Allman et al., 1993**).

## **I. Présentation de l'organisme d'accueil : laiterie Tchîn lait / Candia**

Tchin-Lait/Candia est une entreprise laitière moderne implantée à Bejaïa. Elle est située sur la route nationale n° 12 au niveau de Bir-Slam. Elle s'étale sur une surface de 3000 m<sup>2</sup>.

La marque Candia est présente en Algérie depuis plusieurs années grâce à ses exportations de lait liquide.

Tchin-lait était, à l'origine, une entreprise familiale, spécialisée dans les boissons gazeuses depuis 1954. Elle a, de ce fait, capitalisé une longue expérience dans le conditionnement des produits sous forme liquide.

Cette laiterie a été créée en 2000, et en 2001 les premières briques de lait Candia ont été produites après la signature de la franchise avec Candia France.

Tchin-Lait dispose de deux centres de distribution, l'un à Bejaïa et l'autre à Alger (Hammadi) pour desservir la capitale.

### **I.1. Organisation**

La laiterie Tchîn-lait est détenue majoritairement par M<sup>f</sup> Fawzi BERKATI gérant de la société qui dirige les différentes structures administratives.

L'unité fonctionne avec un effectif total de 242 personnes, 14 % d'entre eux sont des cadres, 24 % des agents de maîtrise, et 62 % des agents d'exécution.

La structure organisationnelle de l'entreprise Tchîn-lait/Candia repose sur un modèle hiérarchique classique. Les différentes Directions de cette entreprise sont représentées sur la figure n°2 (Annexe II).

**I.2. Les différents produits fabriqués**

La gamme de production de Tchik-lait est diversifiée, elle est résumée dans le tableau suivant :

**Tableau IV** : Les différents produits fabriqués par Tchik lait/ Candia.

<b>Nature du produit</b>	<b>Conditionnement</b>	<b>Exemples</b>
<b>Lait longue conservation</b>	Conditionné en emballage Tétra Pack ou Combi bloc de 1 litre.	Lait stérilisé(UHT) : -Entier. - Partiellement écrémé. -Ecrémé dénommé « Silhouette » enrichi en vitamine D. -« VIVA » partiellement écrémé enrichi en 10 vitamines : B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12, E, et D.
<b>Laits boissons</b>	Conditionnés en emballage Combi bloc (Tétra Pack avec bouchon) 1 litre, Tétra Pack 20 cl avec paille.	Lait stérilisé (UHT) chocolaté, dénommé « Candy-Choco ». Lait additionné de jus de fruits (Orange-Ananas, Pêche-abricot et Fruits des bois) dénommé « lait & jus).
<b>Jus de fruits</b>	Conditionnés en emballage Tétra Pack de 20 cl avec paille et Combi bloc de 1 litre.	Boisson à l'orange. Cocktail de fruits.

## **II. Processus technologique du lait UHT demi écrémé**

Le processus technologique de fabrication du lait UHT est illustré sur la figure n°03.

### **II.1.Reconstitution**

La reconstitution est assurée par un appareil appelé le triblender .Ce dernier est semi-automatique et comprend une vanne manuelle, une turbine et une pompe.

L'eau qui doit être préalablement chauffée à 30-40°C pour faciliter la dissolution et la mouillabilité de la poudre est envoyée dans un circuit fermé «tank - triblender - tank». Le triblender dispose d'une pompe de recirculation : une fois que l'eau est en contact de la poudre, le mélange passe par une turbine qui va accélérer la dispersion puis il est envoyé vers le tank de préparation où il subit une agitation continue, afin de favoriser l'hydratation des composés colloïdaux et d'éviter la formation des agglomérats.

Après mélange de la poudre, l'agitateur et la pompe de recirculation s'arrêtent, et le contenu est laissé au repos environ 60min (temps d'hydratation). Le lait ainsi reconstitué est soutiré du tank par une pompe centrifuge. Il passe ensuite à travers des filtres cylindriques pour l'élimination de toutes impuretés macroscopiques telles que les grumeaux, puis acheminé vers un échangeur de chaleur à plaques où il est refroidi à 5°C par l'eau glacée.

#### **Remarque**

Pour améliorer la solubilité du lait en poudre on pratique, lors du séchage, une opération dite « d'instantanéisation », qui consiste à réhumidifier légèrement la poudre par la vapeur, puis à la sécher de nouveau (**Cheftel et Cheftel, 1986**).

### **II.2. Pasteurisation**

Le lait frais, après filtration doit être soumis rapidement à la pasteurisation. Ce traitement vise après tout, à détruire les formes végétatives de certaines bactéries pathogènes et bactéries thermophiles (**Cheftel et Cheftel, 1986**).

**II.2.1. Préchauffage**

Cette opération se fait généralement à l'aide d'un appareil à plaques dans la section de préchauffage où le lait refroidi à 5°C, sera chauffé à une température de 68°C par circulation d'eau chaude.

**II.2.2. Dégazage**

Si le lait a été désaéré, la conservation est encore meilleure, car l'oxydation des lipides est évitée, et l'on ne perçoit plus aucun « goût de cuit » (**Cheftel et Cheftel, 1986**).

Le lait préchauffé à 68°C, est introduit tangentiellement dans la cuve sous vide. Les gaz véhiculés par la vapeur montent vers le haut de la chambre et sont aspirés par la pompe sous vide placée en haut de celle-ci, alors que les vapeurs se condensent dans le condenseur en spirale et retombent dans le produit liquide.

**II.2.3. Homogénéisation**

Elle consiste en un fractionnement mécanique des globules gras du lait, afin de ramener leur diamètre à un chiffre voisin de 1 à 2µm. Cette opération réduit leur force de coalescence et empêche l'écémage et assurant ainsi une stabilité physique du lait (**Semasaka, 1986**).

Le lait passe à travers des orifices ou valves très étroites ; à vitesse élevée et à une pression de 60 bars.

**II.2.4. Pasteurisation HTST**

Le lait homogénéisé est introduit dans le compartiment de chauffage du pasteurisateur où il subit une pasteurisation HTST à 90°C par un circuit d'eau chaude, puis vers un chambreur tubulaire où il séjourne 30 secondes. Ensuite le lait pasteurisé est refroidi à une température de 5°C avec de l'eau glacée, puis stocké dans des tanks tampons (TT).

**II.3. Stérilisation UHT****II.3.1. Préchauffage**

Le lait pasteurisé à 5°C est pompé du tank tampon vers le bac de lancement de l'installation UHT, puis vers la section de chauffage de l'échangeur à plaques où il est chauffé à 75°C.

### **II.3.2. Homogénéisation**

Le lait préchauffé subit une homogénéisation à une pression de 200bars afin d'améliorer la texture et la stabilité physique du lait (**Gosta, 1995**).

### **II.3.3. Stérilisation UHT proprement dite**

Le produit préchauffé homogénéisé, gagne la section de chauffage final de l'échangeur de chaleur à plaques où il est chauffé à 140°C. Le fluide de chauffage utilisé est de l'eau chaude en circuit fermé, le produit passe ensuite dans un chambreur dimensionné de manière à assurer un séjour de 4 secondes (**Gosta, 1995**).

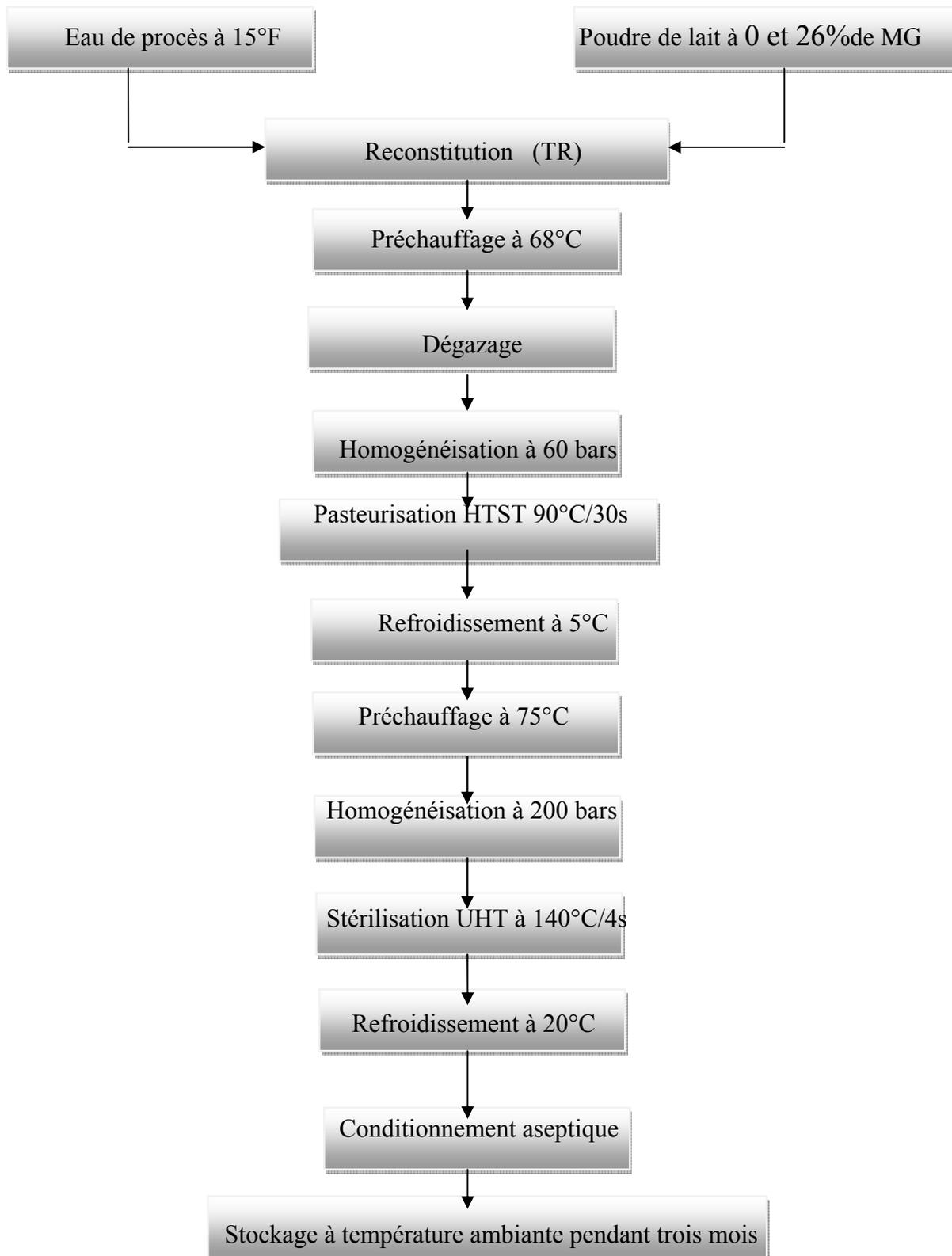
Par la suite, le lait subit un refroidissement jusqu'à 20°C puis envoyé dans des tanks stériles (TS).

### **II.4. Conditionnement aseptique**

Cette opération consiste en la mise en boîtes du produit fini par un appareil nommé tétra brick aseptique (TBA), dans lequel les briques sont stérilisées (**Bauer et al., 2001**).

La stérilisation se fait par trempage préalable de la bande de carton dans une solution froide ou chaude (80°C) de peroxyde d'hydrogène à 17%, la durée de bain est de 8 à 9 secondes. Un air stérile est projeté à forte pression sur chaque face du papier. Le film de peroxyde d'hydrogène est ainsi complètement éliminé et le matériau est parfaitement sec (**Gandon et al., 1974**).

Les récipients doivent donc être opaques, imperméables aux gaz et aux liquides, sans saveur ni odeur, résistants aux prétraitements chimiques ou thermiques et faciles à l'utilisation.



**Figure n°03 :** Diagramme de fabrication du lait stérilisé UHT demi écrémé (Candia).

**II.5. Nettoyage et désinfection**

Afin d'assurer une qualité hygiénique satisfaisantes du lait, les opérations de nettoyage et de désinfection sont essentielles afin d'éliminer toutes les souillures visibles et invisibles.

On distingue deux types de nettoyage :

**II.5.1. Nettoyage intermédiaire aseptique (NIA)**

La mise en œuvre de ce procédé de stérilisation UHT suppose donc la réalisation à intervalles réguliers (toutes les 6 à 8 h) d'opérations de nettoyage et de désinfection dont la durée totale est de 1 à 2 h. En fonctionnement continu, ces opérations occupent généralement un sixième de 24 heures (**Perlat et al., 1986**).

**II.5.1. Nettoyage en place (NEP)**

Il est extrêmement important de prévoir de bonnes installations de nettoyage (NEP) et d'utiliser des détergents, des désinfectants et de l'eau de très bonne qualité.

L'appareillage doit être rincé, lavé avec un détergent alcalin puis avec une solution acide, rincé à nouveau et enfin désinfecté après chaque opération. L'ordre d'utilisation de ces solutions n'est pas défini de manière rationnelle et varie d'une usine à l'autre. À cette fin, il doit être entièrement démontable, accessible en tout point au nettoyage, sans volumes morts pouvant être le siège d'une prolifération bactérienne (**Cheftel et Cheftel, 1986; Perlat et al., 1986**).

### **III. Matériels et Méthodes**

La démarche qualité va au-delà d'un simple contrôle du produit fini. Elle prévoit de faire en sorte que les qualités du produit fabriqué en particulier sanitaires, soient toujours optimales afin d'assurer le zéro défaut. Cette démarche qualité s'intéresse aux matières premières, au processus de fabrication, de conditionnement, de conservation et de distribution. Toute la chaîne est ainsi concernée par les analyses et les conséquences des analyses sur les modifications des procédés utilisés (**Joffin et Joffin, 2003**).

L'étude porte sur le suivi de la qualité du lait UHT demi écrémé produit par la laiterie Tchic Lait/Candia.

#### **III.1. Mode de prélèvement et méthodes d'analyses**

##### **III.1.1. Mode de prélèvement et d'échantillonnage**

Les échantillons analysés doivent être de volume suffisant et représentatif. Le prélèvement doit naturellement se faire de façon aseptique et les analyses doivent être entreprises le plus rapidement possible car le développement des microorganismes modifie les résultats (**Joffin et Joffin, 2003 ; Rouillard, 2004**).

##### **a. Poudre de lait**

Avant de procéder à l'échantillonnage, la vérification concernant l'étiquetage des sacs à été effectuée. La poudre de lait doit en effet répondre aux mentions réglementaires (**JORA N° 80, 1999**).

- ✓ Le poids net du produit
- ✓ La date de fabrication
- ✓ La date limite d'utilisation
- ✓ La teneur en matière grasse
- ✓ Le pays d'origine
- ✓ Le pays d'importation
- ✓ Le numéro du lot
- ✓ l'usine de fabrication

Cinq échantillons par lot sont prélevés.

A l'aide d'un ciseau stérile, on ouvre le sac à côté du bec bunsen et avec une sonde ou une cuillère appropriée en acier inoxydable ou aluminium stérilisée, 10g de poudre sont

prélevés pour chaque échantillon puis déversés immédiatement dans le récipient destiné à contenir l'échantillon.

**b. Eau**

Le prélèvement s'effectue de façon manuelle au niveau de la station du traitement des eaux située en aval du traitement UV.

L'échantillonnage a été réalisé dans des conditions d'asepsie rigoureuses. Il s'agit d'une surveillance de l'eau destinée au processus de fabrication dans l'industrie afin d'effectuer les analyses physico-chimiques et microbiologiques. La quantité d'eau à prélever est de 1L, de préférence dans des flacons en verre pyrex stérilisés et étiquetés. Pour chaque analyse deux échantillons sont prélevés.

**Remarque**

Dans le cas de prélèvement d'eaux chlorées ou bromées, il est nécessaire d'ajouter dans le flacon du thiosulfate de sodium pour les neutraliser (**Rodier et al., 1996**).

**c. Lait pasteurisé**

Le prélèvement se fait à l'aide d'une aiguille stérilisée introduite dans le tank de pasteurisation à travers une membrane. Toutes les opérations doivent s'effectuer dans les meilleures conditions d'asepsie possibles. L'échantillon est rapidement transporté au laboratoire.

**d. Produit fini****➤ Pour la méthode classique**

Les dispositions réglementaires (**JORA N°35, 1998**) fixent le nombre d'échantillons à prélever à 5 unités par lot.

Ces échantillons sont retirés de la chaîne de production au début, à 25 %, à 50 %, à 75 % et à la fin du conditionnement.

Ce plan d'échantillonnage permet de prendre en compte la variabilité statistique.

**➤ Pour le test à la résazurine et la cytométrie en flux**

Le prélèvement a été réalisé par un système dit PAE (Prélèvement Automatique d'Échantillons) où la machine prélève automatiquement une brique sur 1000 unités.

Les pilotes conditionneuses prélèvent aussi tout au long du process :

- 10 briques à chaque départ de production ;
- 4 briques à chaque raccord papier, raccord film, raccord patch, et raccord tab ;
- 6 briques à chaque arrêt de la TBA (Arrêt court et Arrêt long) ;
- 4 briques prélevées avant, pendant et après chaque nettoyage (NIA et NEP).

Cependant la taille de l'échantillon peut augmenter ou diminuer suivant les résultats d'analyse :

Si on a plusieurs échantillons non stériles, la taille de l'échantillonnage est augmentée.

Si on a plusieurs échantillons stériles, on recourt à la diminution de la taille de l'échantillonnage.

Toutes ces briques seront incubées à 35°C pendant 24h ou 48h, pour la cytométrie en flux et jusqu'à 72 heures pour la résazurine.

Les briques sont ensuite numérotées suivant l'ordre de conditionnement, avant de procéder à l'analyse.

### **III.1.2. Méthodes d'analyse**

Trois méthodes d'analyse ont été mises en œuvre à cet effet :

- La méthode classique (bactériologique) ;
- La méthode de réduction (Test à la résazurine) ;
- La cytométrie en flux.

#### **III.1.2.1. Méthode classique**

L'analyse microbiologique des produits alimentaires est indispensable pour :

- Assurer aux produits une bonne qualité et une bonne conservation;
- Assurer la garantie hygiénique et la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes et des toxines microbiennes (**Guiraud, 1998**).

Le dénombrement est réalisé à l'aide de deux méthodes appropriées selon le milieu de culture utilisé (milieu solide et milieu liquide), Voir tableau V (Annexe V).

#### **A. Analyses microbiologiques de la poudre de lait**

Le protocole d'analyse de la poudre de lait à 0% de MG et celle à 26% est le même.

Peser aseptiquement 10g de poudre de lait dans un flacon stérile et ajuster par 90 ml de la solution Ringer diluée au quart, suivi d'une agitation. Une série de dilutions décimales sont ensuite réalisées à partir de cette solution mère (jusqu'à la dilution  $10^{-3}$ ).

Les analyses microbiologiques sont résumées dans le tableau VI et la figure n°04 (Annexe VI).

**Tableau VI : Analyses microbiologiques de la poudre de lait (Mode opératoire de l'entreprise ; Guiraud, 2003).**

<b>Germes</b>	<b>Mode opératoire</b>
<b>FTAM</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-ensemencer en masse deux boîtes de Petri par 1ml de la dilution <math>10^{-2}</math> et <math>10^{-3}</math> puis couler la gélose PCA.</li><li>- Incuber les boîtes dans une étuve réglée à 30°C/ 72h.</li></ul>
<b>Coliformes totaux</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>-ensemencer une série de 3 tubes de 10 ml de BLBVB par 1ml de dilution mère (<math>10^{-1}</math>).</li><li>- Incuber à 30°C/48h.</li><li>- Réaliser un repiquage à partir des tubes incubés sur le même milieu BLBVB.</li><li>- Incuber les tubes ensemencés à 30°C/ 24 h.</li></ul>
<b>Clostridium sulfito-réducteurs</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Porter un tube contenant 20 ml de la solution mère à 80°C/ 10 minutes au bain marie.</li><li>- Après refroidissement, ensemencer 1tube par 10 ml et un autre par 1ml et ajuster jusqu'à 20 ml par le milieu VF additionné de sulfite de sodium et d'alun de fer, le milieu est ensuite recouvert d'une couche de vaseline.</li><li>- Incuber à 44°C/48h.</li></ul>

Voir le tableau VII de dénombrement de germes dans la poudre de lait sur une série de trois tubes par la méthode NNP (Annexe V).

### **B. Analyses microbiologiques de l'eau**

Les Analyses microbiologiques de l'eau de ville et de l'eau de reconstitution sont représentés dans le tableau VIII et les figures n°05 et 06 (Annexe VI).

**Tableau VIII:** Analyses microbiologiques effectuées sur l'eau de ville et l'eau de reconstitution (Guiraud, 2003).

Germes	Méthodes
<b>FTAM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ensemencer en masse le milieu PCA par 1ml d'échantillon et incubé à 30°C/72h.</li> </ul>
<b>Coliformes totaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une série de 9 tubes contenant un milieu de culture sélectif lactosé (BCPL) est ensemencée comme suit :               <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 3 tubes simples concentrés (S/C) par 0,1 ml de l'échantillon.</li> <li>➤ 3 tubes (S/C) par 1ml de l'échantillon.</li> <li>➤ 3 tubes doubles concentrés (D/C) par 10 ml de l'échantillon.</li> </ul> </li> <li>- Incuber à 37°C/48h.</li> </ul> <p>Les tubes positifs sont représentés par un virage du violet au jaune avec production de gaz (environ 1/10 de la cloche).</p>
<b>Coliformes fécaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Repiquage à partir des tubes BCPL positifs sur le milieu Schubert.</li> <li>- Incuber à 44°C/24h.</li> </ul>
<b>Streptocoques fécaux (Eau de ville)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dans un flacon contenant 50 ml de milieu Rothe D/C on ensemence 50 ml d'eau.</li> <li>- Incuber à 37°C/48h.</li> </ul>
<b>Clostridium sulfito-réducteurs (Eau de ville)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ensemencer en masse un tube contenant 20 ml d'eau avec 20 ml du milieu VF (forme végétative).</li> <li>- Porter un autre tube contenant 20 ml d'eau à 80°C/ 10 minutes au bain marie, puis refroidir.</li> <li>- A partir de ce dernier, ensemencer un tube par 1 ml et ajuster jusqu'à 20 ml par le milieu VF (forme sporulée).</li> <li>- Incuber à 46°C/48h.</li> </ul>

### C. Analyses microbiologiques du lait pasteurisé

Les analyses microbiologiques effectuées sur le lait pasteurisé sont présentées dans le tableau IX et la figure n°07 (Annexe VI).

**Tableau IX : Méthodes de dénombrement de germes dans le lait pasteurisé (mode opératoire de l'entreprise).**

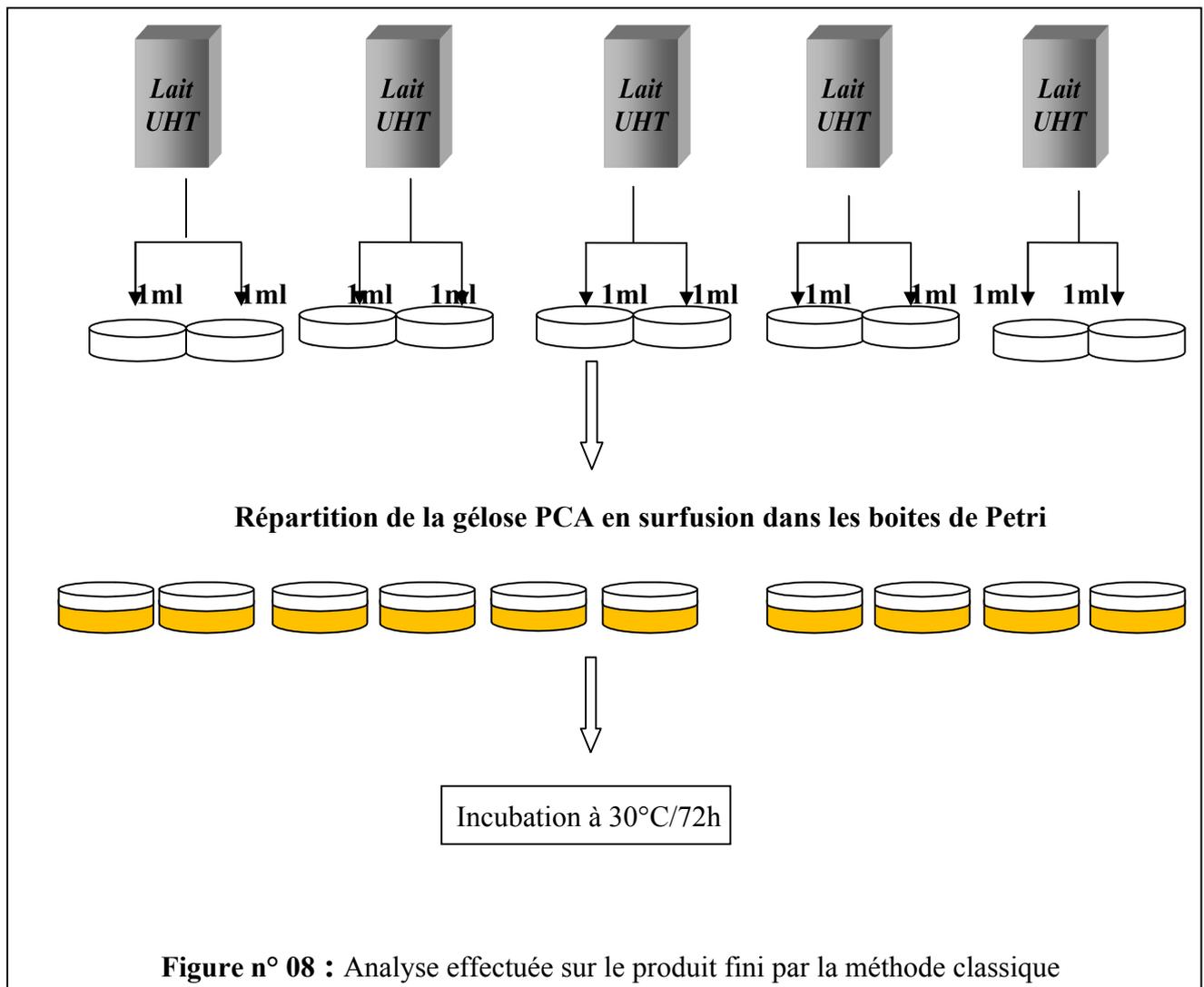
<b>Germes</b>	<b>Méthodes</b>
<b>FTAM</b>	- Sur milieu PCA, une série de deux boites de Petri estensemencée en masse par 1ml du lait pasteurisé, et incubée à 30°C/72h.
<b>Coliformes totaux</b>	- Ensemencer en masse 1 ml du lait pasteurisé dans le milieu VRBL et incuber à 30°C/48h.
<b>Coliformes fécaux</b>	- Ensemencer en masse 1 ml du lait pasteurisé dans le milieu VRBL et incuber à 44°C/24h.

#### **D. Méthode de dénombrement de germes dans le produit fini**

D'après le **JORA N°35 (1998)**, la flore mésophile aérobie totale, est recherchée dans le lait UHT. Pour ce faire :

- Essuyer et désinfecter la surface supérieure des briques à analyser par l'alcool.
- Ensemencer les boites de Petri avec 1ml de chaque brique, puis couler la gélose PCA, et incuber les boites à 30°C / 72 h.

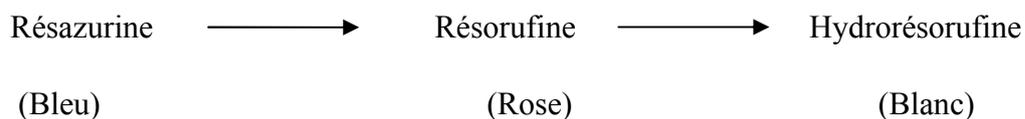
Le protocole de dénombrement des microorganismes dans le produit fini est représenté dans la figure n°08.



### III.1.2.2. Test à la résazurine

#### ➤ Principe

Le potentiel redox du lait est évalué par colorimétrie, la résazurine est utilisée comme un indicateur coloré dont l'évaluation est la suivante :

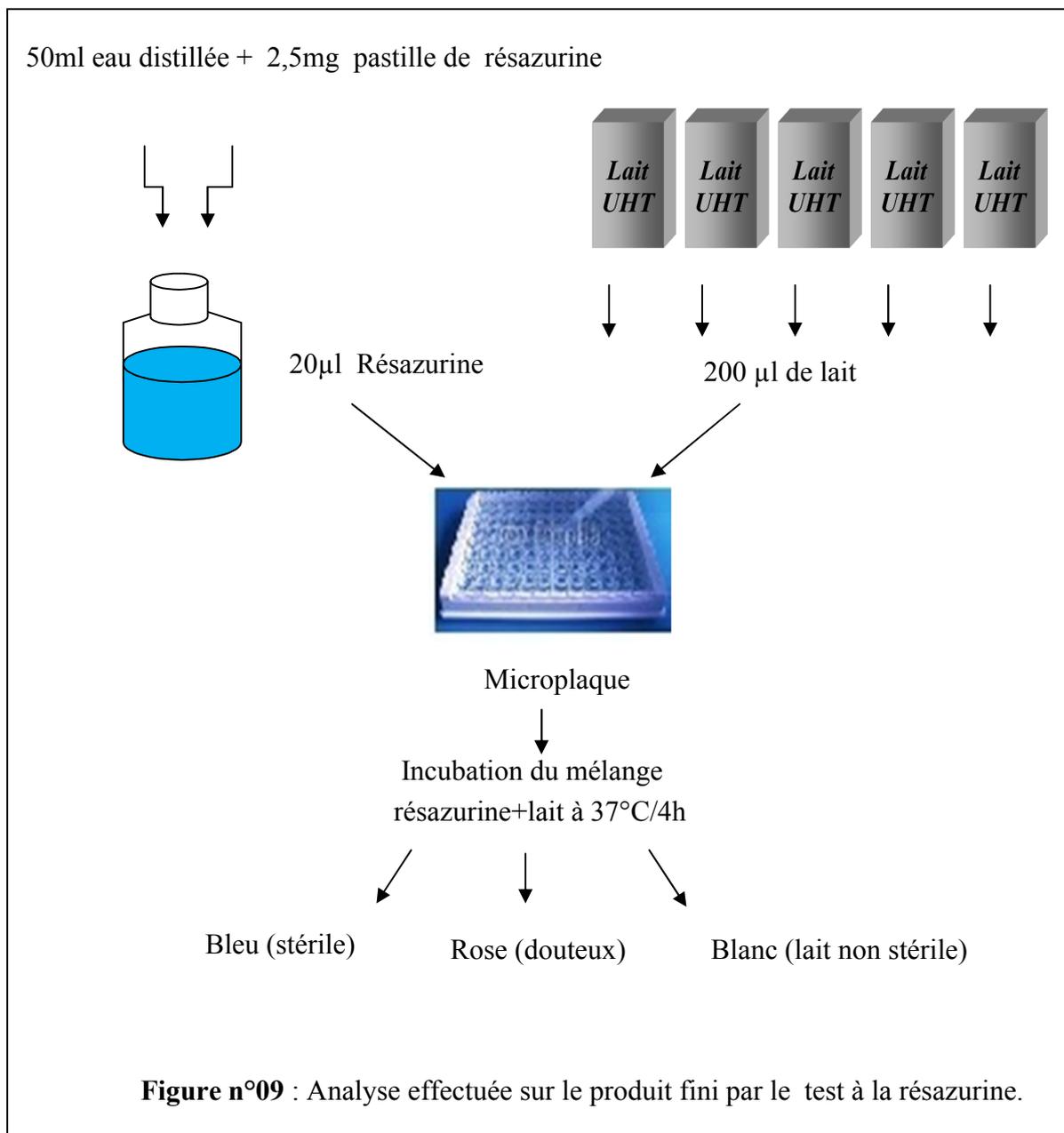


#### ➤ Mode opératoire

- Préparer les microplaques au fur et à mesure des besoins.

- Distribuer 20µl de la solution de résazurine à 5%, sur la microplaque à l'aide d'une micropipette multicanaux dans les conditions les plus proches possibles de la stérilité puis on couvre avec du papier aluminium ;
- Rajouter 200µl de lait à tester dans les puits des microplaques en utilisant la micropipette ;
- Incuber les microplaques de mélange ( lait + résazurine ) pendant quatre heures à l'étuve à une température de 37 °C.
- Contrôler régulièrement la couleur et noter l'heure à laquelle une décoloration complète est obtenue.

Le mode opératoire est schématisé dans la figure n°09.



**III.1.2.3. Cytométrie en flux****➤ Mode opératoire****❖ Préparation des solutions de marquage**

Le mélange réactionnel à mettre en œuvre en fonction du nombre de tests à réaliser (voir le tableau X (Annexe VII)).

Préparation des mélanges A et B (solutions de marquage), si on considère que le nombre d'échantillon est de 80 :

- Mélange A : 4 ml de la solution de marquage, préparée en mélangeant, dans l'ordre suivant, et en agitant entre chaque étape :
  - 4x960 µl d'eau stérile;
  - 40 µl de la solution reconstituée de marqueur 1 ;
  - 120 µl de la solution reconstituée de marqueur 2.
- Mélange B
  - 4x890 µl d'eau stérile;
  - 240 µl de la solution d'inducteur;
  - 200 µl de la solution reconstituée de marqueur 3.

Ces mélanges réactionnels doivent être conservés à l'abri de la lumière et utilisés quelques heures après leur préparation.

En plus de ces mélanges, une solution (DPCC) de contre marquage est utilisée.

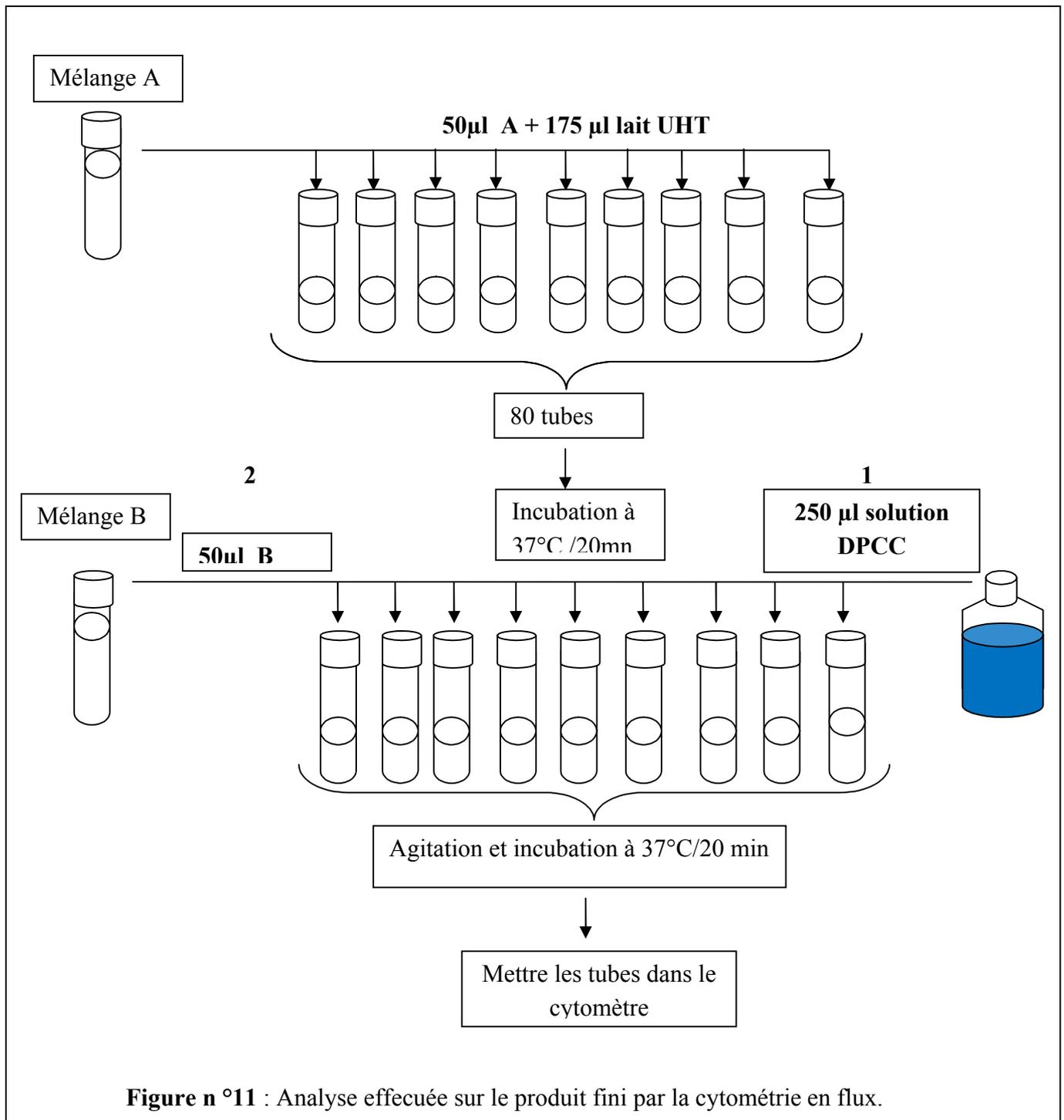
**❖ Préparation de l'échantillon**

- Prélever 175 µl d'échantillon à analyser et transférer dans un tube ;
- Ajouter 50 µl du mélange réactionnel A et agiter ;
- Incuber pendant précisément 20 min à 37 °C à l'obscurité ;
- Ajouter 250 µl de solution de contre marquage et agiter ;
- Ajouter 50 µl du mélange réactionnel B et agiter ;
- Incuber pendant 20 min à 37°C à l'obscurité.

**Remarque**

En cas de plusieurs échantillons de la même minute on divise les 175 µl sur le nombre d'échantillons.

Le mode opératoire de l'analyse du produit fini par la cytométrie en flux est schématisé sur la figure n° 11.



❖ **Analyse** (Manuel de l'appareil, 2006).

- Disposer les tubes à analyser dans un carrousel pour le cytomètre ;
- Sélectionner le protocole « FTlait.pro » dans la liste des protocoles ;
- Lancer l'analyse automatique.

➤ **Nettoyage du cytomètre**

Avant de lancer une analyse d'un produit, l'appareil doit être nettoyé le matin (nettoyage du matin), et après avoir terminé l'analyse l'appareil doit être nettoyé le soir (nettoyage du soir).

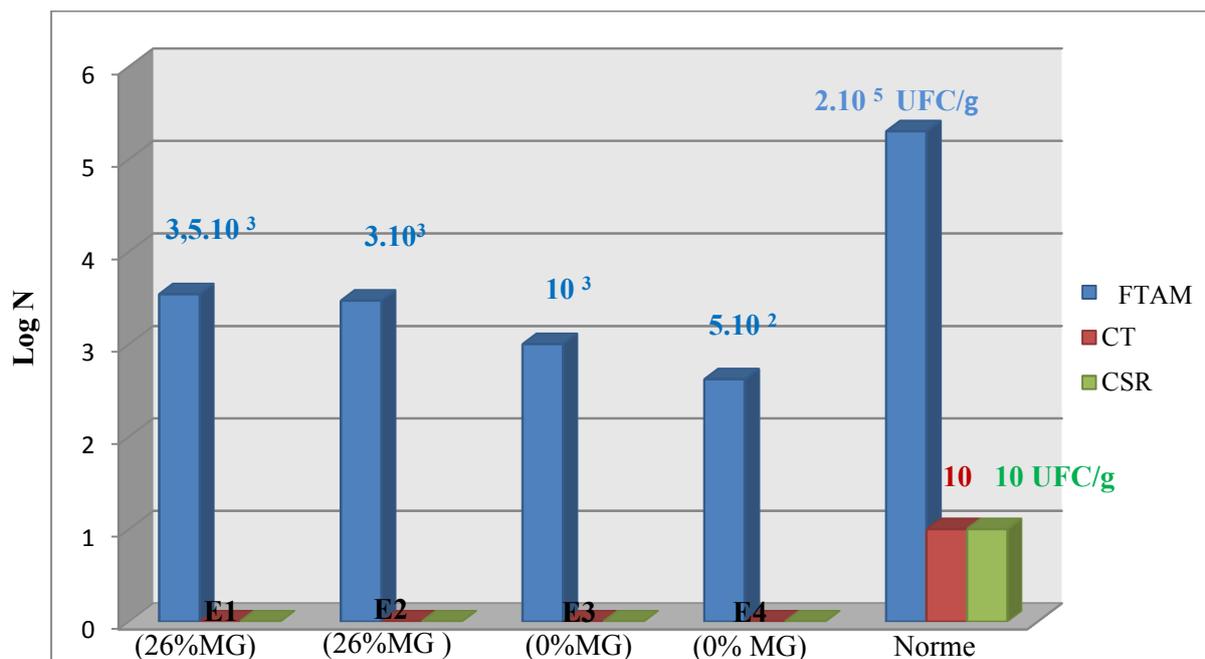
Les deux types de nettoyage sont présentés dans (les figures n°12 et 13) (Annexe VII).

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Qualité des matières premières

##### III.1.1. La poudre de lait

Les résultats des analyses microbiologiques de la poudre de lait (à 0 et 26% de MG) sont illustrés dans le tableau XI (Annexe VIII) et la figure n°14 :



N : Nombre de germes (UFC/g de poudre de lait).

E : Echantillon.

**Figure n°14 :** Représentation graphique des résultats d'analyses effectuées sur la poudre de lait.

Comme le montre la figure n°14, l'analyse a porté sur quatre échantillons de poudre de lait (deux lots à 26% de MG, et deux lots à 0% de MG). Tous les échantillons mettent en évidence l'absence de germes de contamination pour les coliformes totaux et les Clostridium sulfite réducteurs. Les résultats relatifs à la « FTAM » sont en nombre réduit par rapport à la norme (**JORA N°19, 2000**).

Selon les travaux de **Abdenouri et al. (2008)**, la teneur de la poudre de lait en eau est très importante pour déterminer sa qualité. Si le taux d'humidité critique de la poudre est dépassé, les réactions enzymatiques et hydrolytiques des graisses deviennent favorables. Dans tous ces mécanismes, la chaleur a pour effet d'accélérer ces réactions.

La qualité microbiologique de la poudre est importante pour sa conservation voire sa transformation. Plusieurs facteurs peuvent concourir à l'obtention de ces résultats: la stabilité du taux d'humidité, les bonnes conditions de stockage de la poudre, la composition et l'étanchéité des sacs de stockage, la température de stockage, ainsi que les bonnes pratiques d'hygiène du personnel.

Les résultats obtenus montrent que la poudre de lait importée par Tchik lait Candia est stable et conforme aux normes fixées par la réglementation (**JORA N°19, 2000**).

### **III.1.2. L'eau**

Les résultats de la recherche des germes aérobies, coliformes totaux et fécaux, des streptocoques fécaux, et des *Clostridium sulfitoréducteurs* prouvent que les eaux en sont exemptes (Tableau XII, Annexe VIII). Cette absence est un indice de l'efficacité du traitement aux rayons UV effectué par la laiterie.

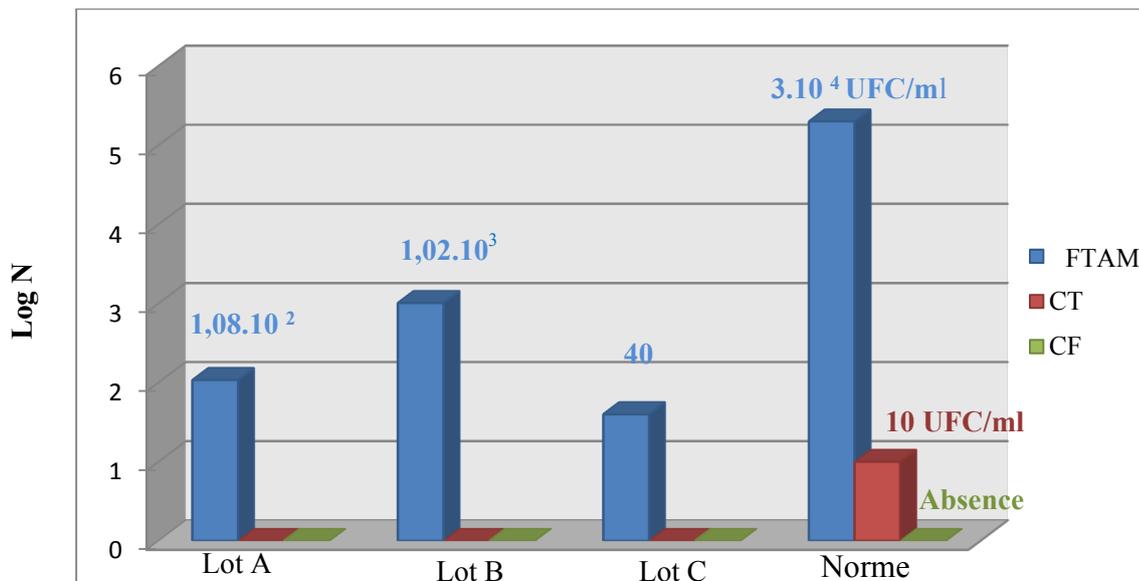
De ce fait, l'eau de process introduite dans le processus de fabrication du lait UHT répond aux critères réglementaires stricts exigés (**JORA N°35, 1998; Guiraud, 2003**).

Selon **Rodier et al. (2009)**, la FTAM n'est pas d'origine fécale. Elle fournit quelques informations ; comme la prolifération de la flore dans un réseau alimenté par une eau mal traitée. De même, l'absence de spores de bactéries sulfito-réductrices constitue le témoin de l'efficacité du traitement appliqué.

Donc, du point de vue microbiologique, l'eau utilisée par Tchik lait/ Candia est de bonne qualité bactériologique.

### **III.2. Qualité du lait pasteurisé**

Les résultats d'analyses effectuées sur le lait pasteurisé sont représentés dans le tableau XIII (Annexe VIII) et la figure n°15.



✚ N : nombre de germes (UFC/ ml du lait pasteurisé).

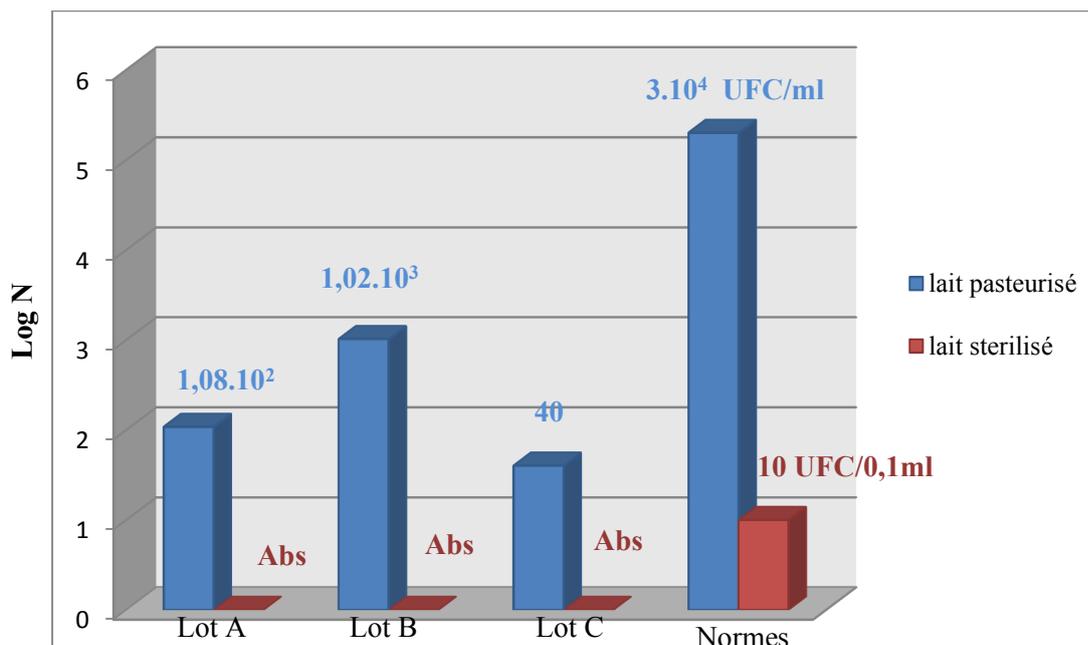
**Figure n° 15 :** Résultats d'analyses du lait pasteurisé.

Les résultats obtenus répondent à la norme recommandée dans ce domaine par la réglementation (**JORA N°35, 1998**), que ce soit pour la FTAM ( $3 \cdot 10^4$ UFC/ml), pour les CT (10UFC/ml) ou pour les CF (Absence). Ce qui signe la bonne maîtrise du processus de pasteurisation ainsi que les bonnes conditions d'hygiène des tanks tampons et les tanks de reconstitutions appliquées par l'unité.

En effet, comme rappelé par **Bonfoh et al. (2001)** ; **Aggad et al. (2010)**, les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication (traitement thermique) permettent de réduire la contamination et la charge microbienne du lait pasteurisé.

### III.3.Comparaison des résultats obtenus lors de la pasteurisation et de la stérilisation

Les résultats des analyses effectuées sur le lait demi-écrémé sont représentés dans le tableau XIV (Annexe VIII) et la figure n°16.



✚ N : nombre de germes (UFC/ml)

**Figure n°16 :** Résultats d'analyses du lait pasteurisé et lait stérilisé.

À partir de la figure n°16, il apparaît que la totalité des germes survivants durant la pasteurisation est détruite par le traitement à ultra haute température ce qui rend le lait UHT obtenu exempt de toute trace de microorganismes contaminants.

Il en ressort que le nombre de la FTAM diminue au fur et à mesure des traitements thermiques appliqués, et prouvent l'efficacité de ces derniers ainsi que le conditionnement dans des emballages hermétique et stériles.

### III.4. Qualité du lait UHT demi écrémé

#### III.4.1. Par la méthode classique

Les résultats d'analyse bactériologique du produit fini sont illustrés dans le tableau XV (Annexe VIII).

Selon **Guiraud (1998)**, la FTAM est un bon indicateur de la stérilité et de la qualité générale des produits.

Les spécifications microbiologiques en vigueur (**JORA N°35, 1998**), précisent que la charge en germes aérobies mésophiles totaux par 0,1 ml ne doit pas dépasser 10 germes pour le lait UHT.

Les résultats des échantillons analysés montrent une absence de la FTAM, indice de la bonne pratique du traitement UHT et des bonnes conditions d'hygiène concernant les conditionneuses, le personnel et l'ensemble de l'atelier.

#### **III.4.2. Par le test à la résazurine**

Les résultats d'analyses effectuées sur le lait UHT demi écrémé sont exprimés par la mesure de la coloration au bout d'un certain temps dans les puits des microplaques (Tableau XVI, Annexe VIII).

Selon les travaux d'**O'Brien et al. (2000)**, la résazurine est utilisée comme indicateur chimique dans l'industrie laitière pour détecter les contaminations microbiennes du lait. Sa réduction par des bactéries change le potentiel redox et induit des changements de couleur.

D'après **Laithier (2011)**, lorsque les bactéries se développent, elles diminuent le potentiel d'oxydoréduction du lait via la consommation de l'oxygène du milieu et produisent des enzymes réductrices permettant d'observer la décoloration. La durée de la décoloration donne une estimation du nombre total des bactéries du lait.

La couleur bleue observée dans tous les puits traduit l'absence d'activité liée aux microorganismes ou un nombre de germes inférieur au seuil de détection de la résazurine qui est de  $3.10^4$  particules indésirables / ml de lait. Ceci suggère que toutes les briques analysées sont stériles.

#### **✓ Remarque**

En cas de résultats douteux, un contrôle secondaire est nécessaire : un ensemencement sur PCA est réalisé, et toute la palette contenant les minutes avant, durant et après la minute concernée sera bloquée à température ambiante pendant 10 jours au minimum pour vérifier la conformité du pH de lait.

#### **III.4.3. Par la cytométrie en flux**

Les résultats d'analyses effectuées par la cytométrie en flux sont représentés dans le tableau XVII (annexe VIII).

D'après **Krishnamurthy et Cram (2010)**, la numérisation des signaux est nécessaire pour tracer les données sous forme d'histogrammes : nuages de points, tracés de contours, densité de points, ou en trois dimensions

Le choix du graphique est en fonction du type de l'étude réalisée et du nombre de cellules pour lesquelles les données seront affichées (**Herzenberg et al., 2006**).

Après analyse des échantillons de lait, le nombre de particules analysées est enregistré dans des tableaux et représenté sous forme de nuages de points (dot-plot) sur des cytogrammes.

Selon **Grégori (2004) et Roché et Niel (2012)**, il est possible de préciser, et de classer la distribution de la fluorescence au sein de chaque fenêtre, dont chaque point correspond à une particule analysée par le cytomètre, ainsi que plusieurs événements peuvent occuper le même point s'ils ont des intensités identiques.

À partir de la distribution de la fluorescence sur les fenêtres du cytomètre BECKMAN COULTER utilisé au niveau de Tchén lait/Candia, on peut préciser deux zones : une zone contenant des particules ayant une relation avec la composition de l'échantillon de lait analysé, et une autre zone comportant des particules définissant la non stérilité du lait; ces dernières n'ont pas été détectées dans les échantillons analysés.

Par conséquent, le lait UHT demi-écrémé analysé par la cytométrie est exempt de germes contaminants.

### **III.5. Comparaison entre les trois méthodes d'analyses**

Toutes les méthodes d'analyses utilisées aboutissent aux mêmes résultats négatifs. Ces derniers indiquent que le traitement UHT appliqué s'avère efficace (jusqu'au produit fini à la sortie de la conditionneuse et aux conditions aseptiques du matériel, du personnel et de toute la laiterie) et permet l'obtention de lait UHT de qualité requise.

Aussi, le lait UHT produit par Tchén lait /Candia est conforme aux normes régissant les laits UHT et notamment les spécifications microbiologiques (**JORA N°35, 1998**).

Néanmoins, les méthodes utilisées (classiques et modernes) présentent des caractéristiques différentes que nous pouvons résumer dans le tableau suivant:

Tableau XVIII : Synthèse des différences notées entre les trois méthodes d'analyses.

Méthodes Caractéristiques	Méthode classique	Méthode de réduction (Résazurine)	Cytométrie en flux
Résultat	Lait stérile	Lait stérile	Lait stérile
Durée d'incubation	72heures après ensemencement	72heures avant l'analyse	24 ou 48 heures avant l'analyse
Efficacité	Stérile ou non stérile	Stérile, douteux ou non stérile	Stérile ou non stérile
Mode d'échantillonnage	5 unités par lot	Dépendant de l'événement	
Seuil de la non stérilité	>10UFC/0,1ml	>3.10 <sup>4</sup> germes/ml	>2.10 <sup>3</sup> particules/ml
Analyse	Nombre de bactéries /unité de mesure	Estimation du nombre de bactéries	Qualitative et quantitative
Libération du produit fini	Après trois jours au minimum	Après trois jours au maximum	Après 24ou 48heures

Une étude de corrélation entre la cytométrie en flux et la technique de référence (mise en culture) dans l'analyse bactériologique du lait a été initiée par **Reyes (2006)**. L'intérêt de la cytométrie en flux dans la détection précoce et la quantification des contaminations microbiologiques du lait ont été mis en évidence.

En plus, la CMF garantit des résultats en quelques heures voire en quelques minutes, alors que les techniques de mise en culture et d'identification bactérienne nécessitent plusieurs jours, ce qui offre au site de production la possibilité de réaliser des économies substantielles.

Aussi le test à la résazurine peut présenter des résultats douteux (peu fiables) qui nécessitent une confirmation par la méthode microbiologique ou par la CMF, alors que la CMF et ses analyses représentent un atout incontestable.

Le contrôle microbiologique de routine est actuellement long (plusieurs jours), ce qui implique souvent :

- De stocker le produit en attendant la réponse (impossible pour les produits très périssables)
- De diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte (**Louis, 2007**).

D'où le recours des industries agroalimentaires à ces méthodes rapides d'analyse microbiologique permettant un gain du temps considérable (**Bouix et al., 1999**).

### **Conclusion**

La présente étude effectuée au niveau de la laiterie Tchîn-lait / Candia a porté sur l'application de trois méthodes d'analyses (méthode classique, test à la résazurine, cytométrie en flux) au contrôle de conformité du lait UHT produit.

Les résultats des analyses microbiologiques obtenus à chaque étape du processus technologique indiquent une application rigoureuse des bonnes pratiques d'hygiène du fait de la réduction remarquable du nombre de microorganismes et souvent par leur absence dans le produit analysé. Ce qui reflète la conformité du produit aux normes exigées par la réglementation Algérienne en vigueur. Il est important de signaler que les résultats obtenus sont dûs d'une part, à la politique qualité fondée sur le respect des bonnes pratiques professionnelles au niveau de tous les ateliers, en commençant par la qualité microbiologique des matières premières ( poudre de lait et eau ), du personnel( bonnes pratiques d'hygiène), de la pertinence et de l'efficacité des traitements antimicrobiens appliqués aux produits pour assurer la satisfaction et la conformité avec la réglementation. D'autre part, la maîtrise du processus de fabrication notamment les barèmes de pasteurisation et de stérilisation ainsi que du conditionnement aseptique ont également contribué au maintien de la qualité obtenue lors des précédentes étapes.

Les résultats obtenus par les trois méthodes d'analyses (mise en culture, méthode de réduction et cytométrie en flux) du produit fini permettent de faire une comparaison entre ces techniques même si le nombre d'échantillons analysés est réduit. Aussi, les méthodes rapides mises en œuvre permettent une libération du produit assez rapide (24heures au lieu de 72heures). Cependant, le coût des appareillages et des réactifs peut constituer un obstacle à l'utilisation de ces équipements pour les analyses de routine.

Par ailleurs, la méthode classique reste toujours une méthode de référence permettant la possibilité de confirmer les nuances de couleur obtenues par la résazurine. De même le nombre d'échantillon reste suffisant pour apprécier la valeur réelle des résultats de la cytométrie en flux.

Enfin, du point de vue économique, la préférence donnée à ces techniques plutôt qu'à la méthode classique se justifie lorsque l'on est dans l'obligation d'avoir très rapidement des

renseignements sur les contaminations éventuelles d'un lait. Il paraît important pour les industriels d'adopter des techniques de contrôle alternatives et/ou complémentaires indispensables pour garantir la qualité des produits commercialisés.

La laiterie Tchik lait/ Candia s'est engagée dans une démarche visant à investir dans la production de lait UHT. Elle a pu arriver en onze années d'expérience à maîtriser le processus de production et les procédures de contrôle, permettant de garantir les critères sanitaires de ses produits et satisfaire sa clientèle. Il paraît recommandable d'effectuer le contrôle microbiologique du lait reconstitué pour estimer l'efficacité pasteurisatrice.

Il est ainsi souhaitable que cette entreprise élargisse l'application de la cytométrie en flux mise en œuvre à d'autres contrôles tels que la vérification de la stérilité des jus et jus au lait produits par cette entreprise qui sont très prisés.

Aussi, dans la perspective de l'intégration du lait cru local dans la fabrication de lait UHT, les techniques d'analyses (résazurine et cytométrie en flux) pourraient également contribuer à l'obtention rapide des résultats d'analyses nécessaires dans le cadre du paiement à la qualité.

**Références bibliographiques**

**A**

**Abdenouri N, Idlimam A, et Kouhila M. (2008).** Etude hygroscopique du lait en poudre. Revue des Energies Renouvelables SMSTS'08 Alger. p35.

**Aggad H, Bridja M, Bouhai A, Benaouali M et Djebli A. (2010).** Some Quality Aspects of Pasteurized Milk in Algeria. Edition: IDOSI Publications. Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, University of Tiaret, Algeria. p21.

**Allman R, Manchee R et Lloyd D. (1993).** Flow cytometric analysis of heterogeneous bacterial populations *in* Lloyd D. Flow Cytometry in Microbiology. Edition: Germany, Springer-Verlag London Limited. pp27-47.

**Amiot J, Fournie S, Lebeuf Y, Paquin P et Simpson R. (2002).** Composition, propriétés physiologiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *in* Vignola CL. Science et technologie du lait: Transformation du lait. Edition: Presses Internationales Polytechnique, Quebec. pp1-73.

**B**

**Bauer W et Besson A. (2001).** Les traitements thermiques in « science alimentaire ». Edition : université de Lausanne. Suisse. pp111-112.

**Bazinet L, Pouliot Y et François C. (2002).** Opérations unitaires *in* Vignola CL. Science et technologie du lait: Transformation du lait. Edition: Presses Internationales Polytechnique, Quebec. p225.

**Beerens H Luquet F M. (1987).** Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et produits laitiers. Edition : Tec et Doc- Lavoisier. Paris. pp5-7.

**Beisson G et MartinezV. (2009).** Spécification technique de l'achat public. Laits et Produits laitiers. Edition : Observatoire économique de l'achat public. pp9-11.

## *Références bibliographiques*

---

**Belhadia M, Saadoud M, Yakhlef H et Bourbouze A . (2009).** La production laitière bovine en Algérie : capacité de production et typologie des exploitations des plaines du Moyen Cheliff. Revue Nature et Technologie *in* Mamine F, Bourbouze A et Arbouche F. La production laitière locale dans les politiques de la filière lait en Algérie. Cas de la wilaya de Souk Ahras. Edition / Livestocks research for rural developpement-Alger.p1.

**Berodier A, Casalta E, Montel M. (2005).** Quelles sont les évolutions de la flore microbienne dans les laits et les fromages ?. Edition : Comité interprofessionnel de Comité. Poligny Cedex. p1.

**Beuvier E et feutry F. (2005).** Quelques bases sur la microbiologie du lait et du fromage. Edition : INRA- CDEO. Poligny Cedex. pp4-5.

**Boisard P. (1994).** Le lait et la machine in Gillet P. mémoires lactées .Edition : Mutations/Mangeurs. Paris. pp196-198.

**Bonfoh B, Fané A, Traoré N A, Coulibaly Z, Simbé C F, Alfaroukh O I, Nicolet J, Farah Z et Zinsstag J. (2001).** Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le district de Bamako au Mali. Edition : Editions Universitaires de Côte d'Ivoire. P248.

**Bouix M, Letellier C, Drocourt J L et Leveau JY. (1999).** Détection rapide des flores d'altération dans les produits alimentaires par cytométrie en flux. Edition : ENSIA-Massy Cedex-France. p26.

**Boularak A. (2005).** Guide des déterminations analytiques des laits et produits laitiers. Edition : Direction Générale du contrôle Economique et de la Répression des Fraudes. Alger. P5.

**Bouvier T, Troussellier M, Anzil A, Courties C, Servois P. (2001).** Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. Cytométrie 44 *in* Jacquet S. impact des apports en nutriments sur le réseau trophiques planctonique du lagon Sud-ouest de nouvelle- Calédonie. p46.

## *Références bibliographiques*

---

**Branger A, Richer M M et Roustel S. (2007).** Alimentation, Sécurité et Contrôle microbiologique. Edition : Educagri. p88.

### **C**

**Carlos J, Bueno A, Chiara F, Michel G, José C NF et Juan C. (2011).** Reduction of resazurin to resorufin catalyzed by gold nanoparticles: dramatic reaction acceleration by laser or LED plasmon excitation. Edition: Catal. Sci. Technol. p1.

**Cheftel J C et Cheftel H. (1986).** Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Edition : Tec et Doc- Lavoisier. Paris. 381P.

**Chye F Y, Abdullah A, Ayob Mk. (2004).** Bacteriological quality and safety of raw milk in MALYSIA. food microbial cité par Ouadghiri M. Biodiversité des bacteries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben et jben » d'origine marocaine. Thèse pour obtenir le docteur en microbiologie et biologie moléculaire. Université Mohammed V-Agdal. Faculté des sciences Rabet. p23.

**Codex Alimentarius. (2000).** Définition des traitements thermiques. Comité du Codex sur le lait et les produits laitiers. Edition OMS et FAO. pp4-5.

### **D**

**Deville J P et Pradier O. (2002).** La cytométrie de flux quantitative. Edition : ULB-Hopital Erasme, Laboratoire d'hématologie, Bruxelles. p2.

**Duperray CH, GostesV, Baldet P, ParpaleixT. (1993).** Cytometrie en flux et en image : principe et applications. Edition: INSERM-Montpellier (France). pp2-4.

### **E**

**Eck A. (1975).** Le lait et l'industrie laitière. Edition : Presse universitaire de France (PUF). 126p.

**El Khoury V. (2006).** Etude de modifications épigénétiques corrélées à l'expression du gène MDR1 et à la texture nucléaire dans des cellules de carcinome pulmonaire H 69 sensibles et résistantes à la chimiothérapie. Thèse de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire. Université de REIMS Champagne-Ardenne. pp94-95.

## *Références bibliographiques*

---

**Ezzahra F et L'Faqihi O. (2007).** Plateau technique de cytométrie. Edition : Toulouse Rio Imaging. P6.

### **F**

**Feinberg M, Favier JC et Irland RJ. (1987).** Répertoire générale des aliments *in* Tables de composition des produits laitiers .Edition : Tec et Doc- Lavoisier. Paris.

### **G**

**Gabli A. (2005).** Etude cinétique des cellules somatiques dans le lait des vaches atteintes de mammites et de vaches saines. Thèse de doctorat pour l'obtention de diplôme d'état en science vétérinaire. Université Mentouri-Constantine, Option Bactério-Immunologie. Faculté des sciences. p21-22.

**Gandon Y, Petit A et Dechy MF. (1974).** Le lait UHT en conditionnement « tétra brick » aseptique. Edition: Laboratoire départemental des services vétérinaires de Val de Marine. pp645-655.

**Greimers R. (2002).** Cytométrie en flux. Edition : Université de Liège. 21p.

**Grégori G. (2004).** Flow cytometry data handling and analysis. Laboratory of Microbiology, Geochemistry, and marine Ecology. Edition: CNRS COM-Marseille. pp17-18. <http://www.com.univ-mrs.fr>.

**Gosta B. (1995).** Les composants des traitements du lait *in* Manuel de transformation du lait. Edition: Tetra packs processing system A.B. Sweden. 442p.

**Guiraud J et Galzy P. (1980).** L'analyse microbiologique dans l'industrie alimentaire. Edition: l'usine nouvelle Paris. 236p.

**Guiraud J P. (1998).** Food microbiology, main food Derivate from international methods *in* Aggad H, Bridja M, Bouhai A, Benaouali M et Djebli A. Some Quality Aspects of Pasteurized Milk in Algeria. Edition: IDOSI Publications. Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, University of Tiaret, Algeria. p1.

## *Références bibliographiques*

---

**Guiraud J P (1998).** Microbiologie alimentaire. Technique d'analyse microbiologique  
Edition: DUNOD. Université Libre de Bruxelles, Paris. 390p.

**Guiraud J P. (2003).** Microbiologie alimentaire. Edition : Dunod. Paris. P652.

**Guiraud JP et Rosec J P. (2004).** Pratiques des normes en microbiologie alimentaire.  
Edition: AFONR. p3.

### **H**

**Herzenberg L A, Tung J, Moore WA, Herzenberg L A et Parks D R. (2006).**  
Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. Edition: nature publishing  
group-USA. pp684-685. [www.facs.scripps.edu.com](http://www.facs.scripps.edu.com).

### **J**

**Jeantet R, Croguemec T, Schuck P et Brulé G. (2007).** Science des aliments :  
Biochimie, Microbiologie, Procédés, Produits. Edition : Tec et Doc-Lavoisier. Paris. pp45-  
46.

**Jeantet R, Croguemec T, Mahaut M, Schuck P et Brulé G. (2008).** Les produits  
laitiers. Edition: Tec et Doc-Lavoisier. Paris. pp1- 23.

**Joffin CH et Joffin J. (2003).**Microbiologie alimentaire. Edition : Centre régional de  
documentation pédagogique d'Aquitaine. 212p.

### **K**

**Krishnamurthy H, Cram L S. (2010).** Basics of flow cytometry *in* Krishan A,  
Krishnamurthy H et Totey S. Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and  
Tissue Regeneration. Edition: Wiley-Blackwell. p5. <http://www.media.wiley.com>.

### **L**

**Lacroix M, Bon C, Bos C, Le'onil J, Benamouzig R, Luengo C, Fauquant J, Tome'D  
et Gaudichon C. (2008).** Ultra High Temperature Treatment, but Not Pasteurization,  
Affects the Postprandial Kinetics of Milk Proteins in Humans. Edition: ASN-Rennes.  
p2346.

**Laithier C. (2011).** Microflore du lait cru. Vers une meilleure connaissance des  
écosystèmes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation .Edition : CNAOL. p56.

<http://www.idele.fr>.

## *Références bibliographiques*

---

**Lamontagne M, Champagne C P, Reitz A J, Moineau S, Gardner N, Lamoureux M, Jean J et Fliss I. (2002).** Microbiologie du lait *in* Vignola CL. Science et technologie du lait. Edition : Presse internationale Polytechnique. pp130-131.

**Larpent J P. (1996).** Laits et produits non fermentés, *In* Bourgeois CM, Musclé J F et Zucca J. microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition: Tec et Doc-Lavoisier, Paris. p272.

**Lehman L G. (2011).** Cour de cytometre. Edition: Université Catholique d'Afrique Centrale. Centre Supérieur des Sciences de la Santé. 31p.

**Leseur et Melik. (1985).** Lait de consommation *In* Luquet FM. Lait et produits laitiers : vache, brebis, chèvre .Edition .Tec et Doc-Lavoisier. Paris. pp3-16.

**Lortal S. et Delage MM. (2008).** Comment conserver le lait ?. « Agriculture, alimentation, environnement ». Edition : INRA-Rennes. P1.

**Louis J. (2007).** Microbiologie alimentaire : contrôle microbiologique des aliments. Département Science et Technologie des industries alimentaires. Edition : Eiffel-Paris. 119p.

### **M**

**Mahaut M, Jeantet R, SchuckP et Brulé G. (2000).** Les produits industriels laitiers. Edition : Tech et Doc-Lavoisier.paris. p175.

**Mathieu J. (1998).** Initiation à la physicochimie du lait. Edition : Tec et Doc-Lavoisier. Paris. p12.

**Michel JC, Pouliot M et Richard J. (2002).** Lait de consommation *in* Vignola. Science et technologie du lait. Edition : Presse internationale polytechnique. p291.

**Mokhtari I. (2009).** La facture alimentaire pèse sur le commerce extérieur/L'Algérie importe 60% du lait consommé localement avec 500 millions de dollars par an cité par Ghoribi L. Etude de l'influence de certains facteurs limitants sur les paramètres de reproduction chez les bovins laitiers dans des élevages de l'Est Algérien. Thèse pour

## *Références bibliographiques*

---

l'obtention du diplôme de doctorat ès Sciences. Université Mentouri Constantine. Faculté des sciences de la nature et de la vie. p12.

### **O**

**O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. (2000).** Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. Edition : FEBS-UK. p5.

**Odet G, Cerf O, Chevillotte J, Douard D, Gillis JC, Halaine E et Lignac J. (1985).** La maîtrise de la qualité du lait stérilisé UHT. Edition :APRIA, Tec et Doc-Lavoisier. Paris. 201p.

**Overton W R. (2006).** Fluorochromes *in* Wulff S. Guide To Flow Cytometry. Edition: DAKO, Carpinteria, California-USA. P19.

### **P**

**Perlat M N, Lalande M et Corrieu G. (1986).** Etude du nettoyage d'un stérilisateur de lait UHT. Ordre d'utilisation des détergents alcalins et acide et aspect cinétique. Laboratoire de génie industriel alimentaire. Edition : I.N.R .A- France. p32.

**Plusquellec A. (1991).** Lait et produits laitiers *In* Bourgeois C M et Leveau J Y. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. Le contrôle microbiologique. Edition Tec et Doc-Lavoisier. Paris. p337.

**Pougheon S. (2001).** Contribution à l'étude des variation de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse pour l'obtention du grade de Docteur vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse. p8.

### **R**

**Rahman M, Andy L, Swindell A et Bartram S. (2006).** Introduction to Flow Cytometry. Edition: Serotec Ltd. Endeavour House. UK. p6.

**Reyes J. (2006).** Cytométrie et microbiologie *In* Ronot X, Grunwald D, Mayol J F et Boutonnat J. La cytométrie en flux. Edition: Tec et Doc –Lavoisier. Paris. pp187-209.

**Rieseberg M, Kasper C, Reardon K F et Scheper T. (2001).**Flow cytometry in biotechnology. Edition: Appl Microbial Biotechnol. 11p.

**Robitaille G. (1995).** Influence of  $\kappa$ -casein and  $\beta$ -lactoglobulin genetic variants on the heat stability of milk cité par Filion M M. Amélioration de la stabilité thermique du lait par modulation du potentiel d'oxydoréduction. Mémoire pour l'obtention du grade: maître des sciences de l'agriculture et l'alimentation faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université laval Québec. P25. <http://www.collectionscanada.gc.ca>

**Roché Y et Niel P. (2012).** Analyses en microbiologie. Produits non stériles. Edition: Techniques de l'Ingénieur-Paris.p8. <http://www.dissertationsgratuits.com>

**Rodier J, Bazin C, Broutin JP, Chambon P, Champsaur H et Rodi L. (1996).** L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Edition : DUNOD-Paris. pp747-748.

**Rodier J. (2005).** L'analyse de l'eau; Eau naturelle, eau résiduaire, eau de mer. Edition : DUNOD-Paris. p747.

**Rodier J, Legube, B, Marlet N et coll. (2009).** L'Analyse de l'eau. Edition : DUNOD. Paris. pp1400-1402.

**Romain J, Croguennec T, Mahaut M, Schuck P et Brulé G. (2008).** Les produits laitiers. Edition : Tec et Doc-Lavoisier. Paris. pp10-11.

**Rosenzwadig M. (2009).** Cytométrie en flux. Service de biothérapies. Edition : UPMC CNRS- Paris. p2.

**Rouillard S. (2004).** Développement des méthodes impedancemétriques et biochimiques pour la détection rapide d'une faible contamination bactérienne en milieu liquide complexe. Thèse de doctorat de l'institut national agronomique paris-Grignon, Discipline : Microbiologie appliquée. Ecole Doctorale ABIÉS. 226p. <http://www.hal.inria.fr>.

### **S**

**Semazaka G. (1986).** Contribution à l'étude de la qualité microbiologique des laits caillés commercialisés dans la région de Dakar (Sénégal). Thèse de doctorat de l'école inter-états des sciences et médecine vétérinaires. 144P. <http://www.beep.ird.fr>

## *Références bibliographiques*

---

**Steijns J N. (2008).** Dairy products and health: focus on their constituents or on the matrix? Cité par Ouadghiri M. biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « lben et jben » d'origine marocaine. Thèse pour obtenir le docteur en microbiologie et biologie moléculaire. Université Mohammed V-Agdal. Faculté des sciences Rabat. p23.

**Strahm W et Ebberhard P. (2009).** Technologie du lait prêt à la consommation. 1<sup>ère</sup> édition : station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP. 32p.

**Strahm W et Eberhard P. (2010).** Technologie du lait prêt à la consommation. 2<sup>ème</sup> édition : station de recherche Agroscope Liebefeld-Posieux ALP. p24.

### **V**

**Veisseyre R. (1975).** Technologie du lait : Constituants, Récolte, Traitement et Transformation du lait. Edition : la maison rustique. Paris. pp1-303.

**Veisseyre R. (1979).** Technologie du lait : Constituants, Récolte, Traitement et Transformation du lait. Edition : la maison rustique. Paris. p709.

**Vignola CL, 2002.** Science et technologie du lait. Transformation du lait. Edition : Presse Internationale Polytechnique. Québec. pp289-291.

**Vishweshwaret S K, Krishnaiah N et Reddy S P. (2005).** Quality Control of Milk And processing Edition: SINDOOR GRAPHICS-India. p84.

### **W**

**Wilkerson J M. (2004).** Principles of Flow Cytometry and Cell Sorting. Edition: American College of Veterinary Pathologists & American Society for Veterinary Clinical Pathology, Middleton WI, USA. p2. <http://www.ivis.org>.

### *Normes et textes réglementaires*

**JORA N°69, 1993.** Arrêté interministériel du 18 Août 1993 relatif aux spécifications et à la présentation de certains laits de consommation.

**JORA N° 35,1998.** Arrêté interministériel du 24 Janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

**JORA N°80, 1999.** Arrêté interministériel du 27 Octobre1999 relatif aux spécifications du lait en poudre industriel et aux conditions et modalités de sa présentation, sa détention, son utilisation et sa commercialisation.

**JORA N° 19, 2000.** Arrêté interministériel du 2 Avril 2000 modifiant et complétant l'arrêté du 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.

### *Références numériques*

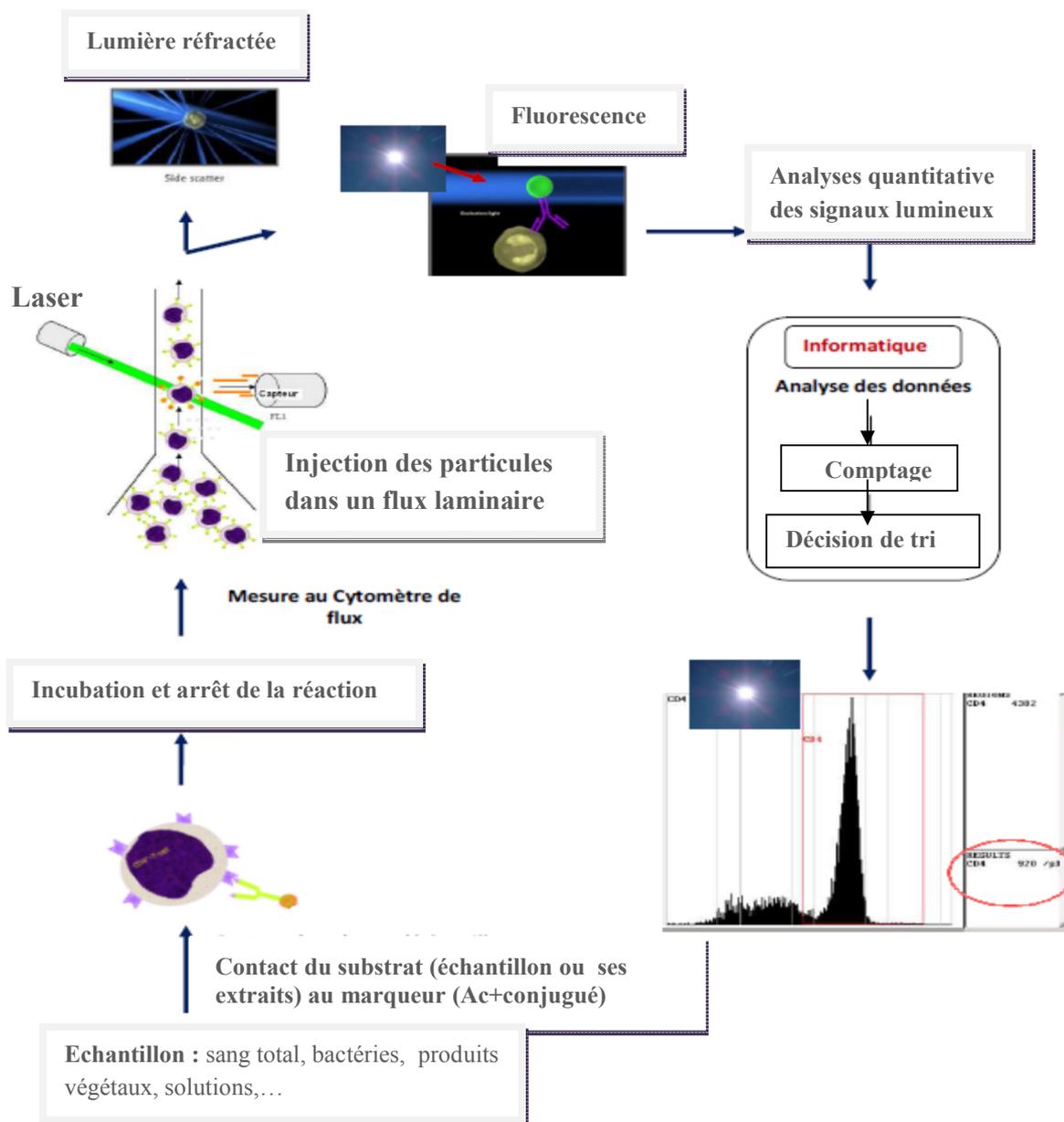
**F.A.O. (1998).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. *In* « Alimentation et nutrition ». <http://www.fao.org>.

**Institut pasteur d'Algérie. (2002).** Catalogue: milieu de culture et réactifs de laboratoire.

**Liberté. (2012).** Baisse des importations de la poudre de lait au 1er trimestre de 2012.Seule 48000 tonnes achetées. <http://www.Liberté-Algerie.com>.

**Manuel/Notice CMF. (2006).**

<http://www.beckmancoulter.com>.



**Figure 01:** Principe de la cytométrie en flux (Lehman, 2011).

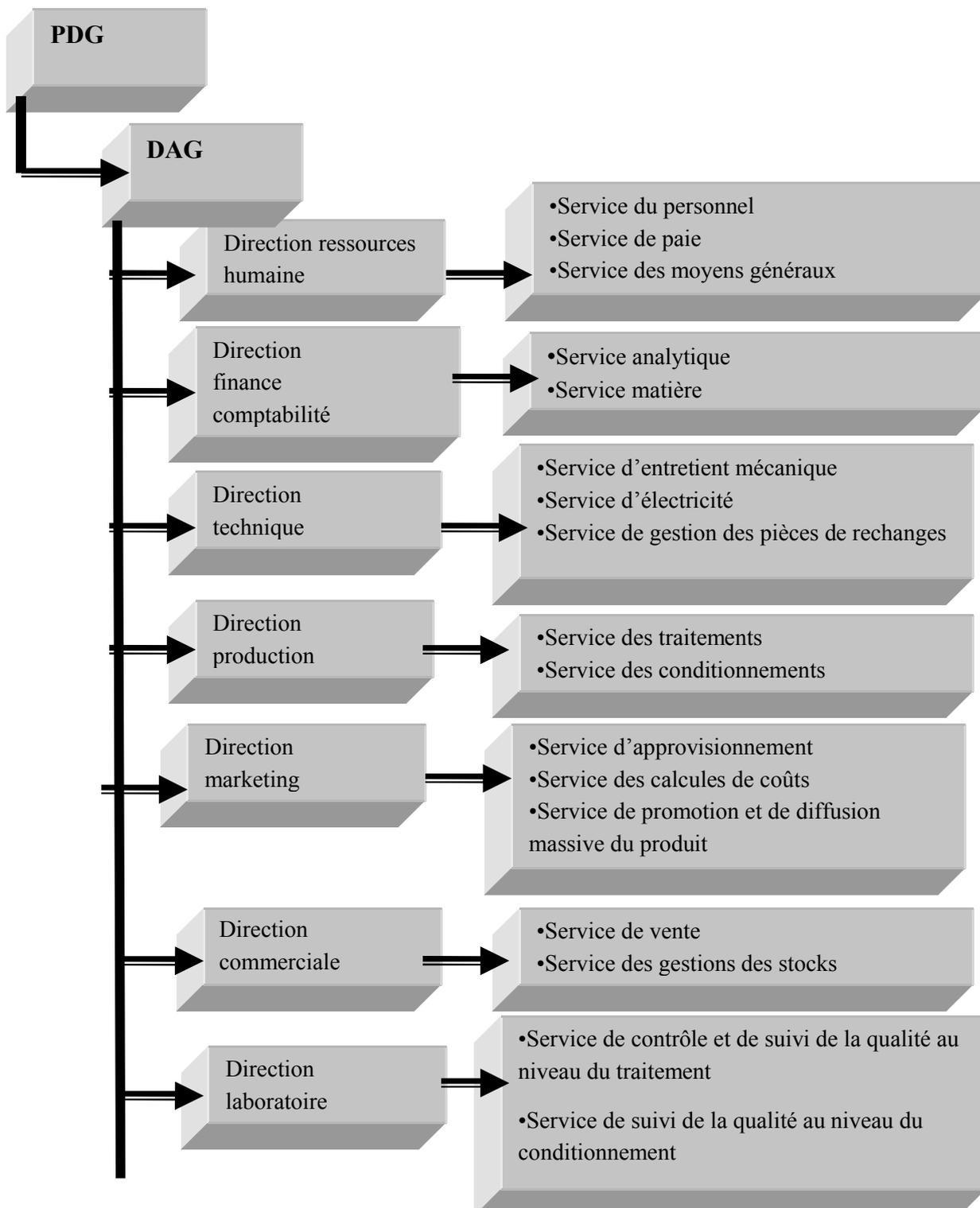


Figure n° 02: Organigramme de l'unité Tchîn-lait/Candia.

## I. Matériels et réactifs utilisés

### I.1. Pour l'analyse microbiologique

- **Matériel utilisé**
  - Bec bunsen.
  - Balance analytique (Denver Instrument Mxx-2001)
  - Agitateur magnétique (Stuart et RS France)
  - Etuves réglés à 30°C, 37°C, à 44°C (JOUAN)
  - Bain marie (STUART)
  - Autoclave.
  - Loupe (Laboratoire HUMEAU France)
  - Boites de pétrie.
  - Tubes à essai stériles.
  - Flacons stériles. (Simax)
  - Pipettes stériles. (Germany)
  - Cloches de Durham.
- **Réactifs et milieux de culture**
  - Liquide de Ringer.
  - Milieu BLBVB.
  - Milieu BCPL.
  - Milieu VF et additifs (Alun de Fer et Sulfite de sodium).
  - Milieu Rothe.
  - Milieu PCA.

### I.2. Pour la méthode de réduction

- **Matériel utilisé**
  - Microplaques de micro-titration comportant 96 puits sous forme U de 320 µl ;
  - Embouts en plastique pour micropipettes de 50 et 1000 µl stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes;
  - Micropipette pour la résazurine multicanaux réglée à 20 µl ;
  - Micropipette pour le lait réglée à 200 µl ;
  - Etuve réglée à 37 °C
- **Réactifs**
  - L'eau distillée.
  - Pastille de résazurine.

### I.3. Pour la cytométrie en flux

#### Matériel utilisé

- Le cytomètre utilisé au niveau de Candia est un cytomètre BECKMAN Coulter de type FC 500.



**Figure 10:** Le cytomètre BECKMAN Coulter de type FC 500.

- Ordinateur lié au cytomètre pour l'analyse des données.
- Etuve réglé à 37°C.
- Bec bunsen.
- Tubes stériles.
- Micropipettes stériles SOCOREX de 20-200 $\mu$ l et de 100- 1000 $\mu$ l.
- Gants en plastique.
- **Réactifs**
  - Marqueurs fluorescents 1, 2, 3,4.
  - Solution de contre marquage.
  - Eau distillée stérile.

➤ **Composition des milieux de culture et des réactifs (Institut Pasteur d'Algérie, 2002).**

**BCPL**

Peptone de caséine.....	7,0g/l
Lactose.....	5,0g/l
Extrait de viande.....	1,0g/l
Bromocrésol pourpre.....	0,03g/l

PH :  $7,2 \pm 0,2$  à 25°C.

**BLBVB**

Bile de bœuf déshydraté.....	20g/l
Lactose.....	10,0g/l
Peptone gélatine.....	10,0g/l
Vert brillant.....	0,0135g/l

PH  $7,2 \pm 0,2$  à 25°C

**Liquide Ringer dilué au ¼**

NaCl.....	9,00g/l
KCl.....	0,42g/l
CaCl <sub>2</sub> (anhydre).....	0,48g/l
Bicarbonate de sodium (NaH CO <sub>3</sub> ).....	0,20g/l

PH 7, 0 à 25°C

**PCA**

Tryptone.....	5g/l
Extrait de levures.....	2,5g/l
Glucose .....	1,0g/l
Gélose.....	15,0g/l

PH  $7,0 \pm 0,2$  à 25°C

**VF**

Base de foie.....	30,0g/l
Glucose.....	2g/l
Agar bactériologique.....	8,0g/l

PH7, 6 ± 0,2 à 25°C

**Milieu Rothe**

Extrait de viande.....	1,5g/l
Peptone.....	20g/l
Glucose.....	4g/l
Azide sodium.....	0,20g/l
NaCl.....	5g/l
Phosphate dipotassique.....	2,70g/l
Phosphate monopotassique.....	2,70g/l

PH 6,8 à 25°C

➤ **Préparation de la solution de Résazurine à 5%.**

Introduire dans un flacon stérile en verre :

- 50 ml d'eau distillée stérile ;
- une pastille de 2,5 mg de résazurine.

### ➤ Les méthodes de numération en bactériologie

#### Numération sur milieu solide (Guiraud, 2003).

La méthode de numération sur milieu solide se fait à l'aide de la formule suivante :

$$N = \frac{\Sigma C}{v (n1 + 0,1 n2) .d}$$

$\Sigma C$ : Somme des colonies comptées sur toutes les boites retenues de deux dilutions successives ;

v : volume de l'inoculum ;

n1 : nombre de boites retenues à la première dilution ;

n2 : nombre de boites retenues à la deuxième dilution ;

d : taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (Guiraud, 2003).

#### Numération sur milieu liquide

**Tableau V** : Tableau de Mac Grady de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP (Rodier et al., 2005).

Nombre caractéristique	Nombre de cellules.	Nombre caractéristique	Nombre de cellules.
001	3	300	23
010	3	301	39
100	4	302	64
101	7	310	43
110	7	311	75
111	11	312	120
120	11	320	93
200	9	321	150
201	14	322	210
210	15	330	240
211	20	331	460
220	21	332	1100
221	28		

**Tableau VII** : Tableau de dénombrement de germes pour une série de trois tubes par la méthode NPP (**JORA N°19, 2000**).

Nombre de tubes positifs	NPP par gramme	Limite de confiance	
		99%	95%
0	<4	<1	1
1	4	32	24
2	11	2	3
3	>11	64	48

Le résultat est exprimé par le nombre le plus probable de coliformes contenus dans un gramme de produit, accompagné éventuellement des valeurs les plus faibles et les plus élevées correspondent aux limites de confiances de 99% et 95%.



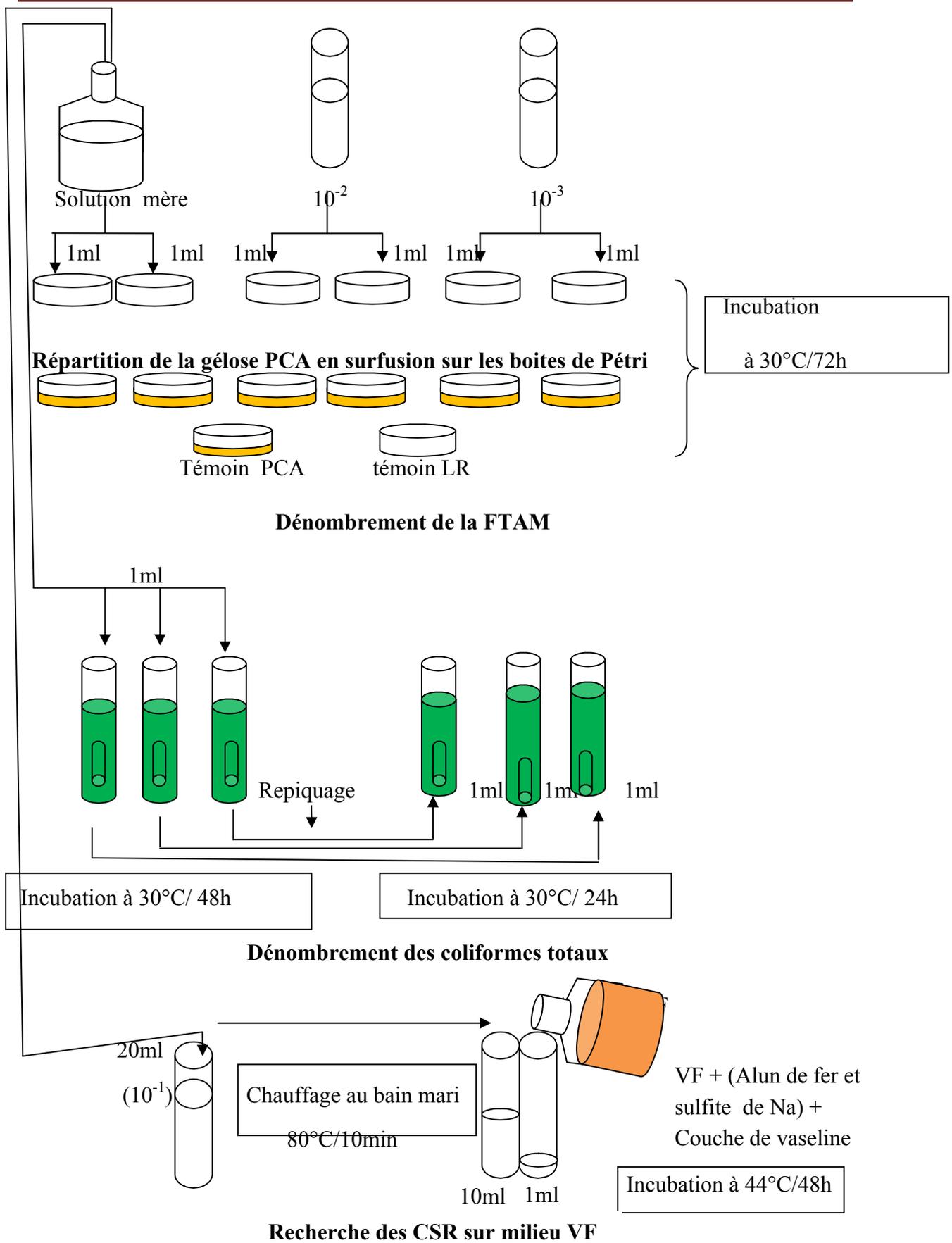


Figure n° 04: Analyses effectuées sur la poudre de lait

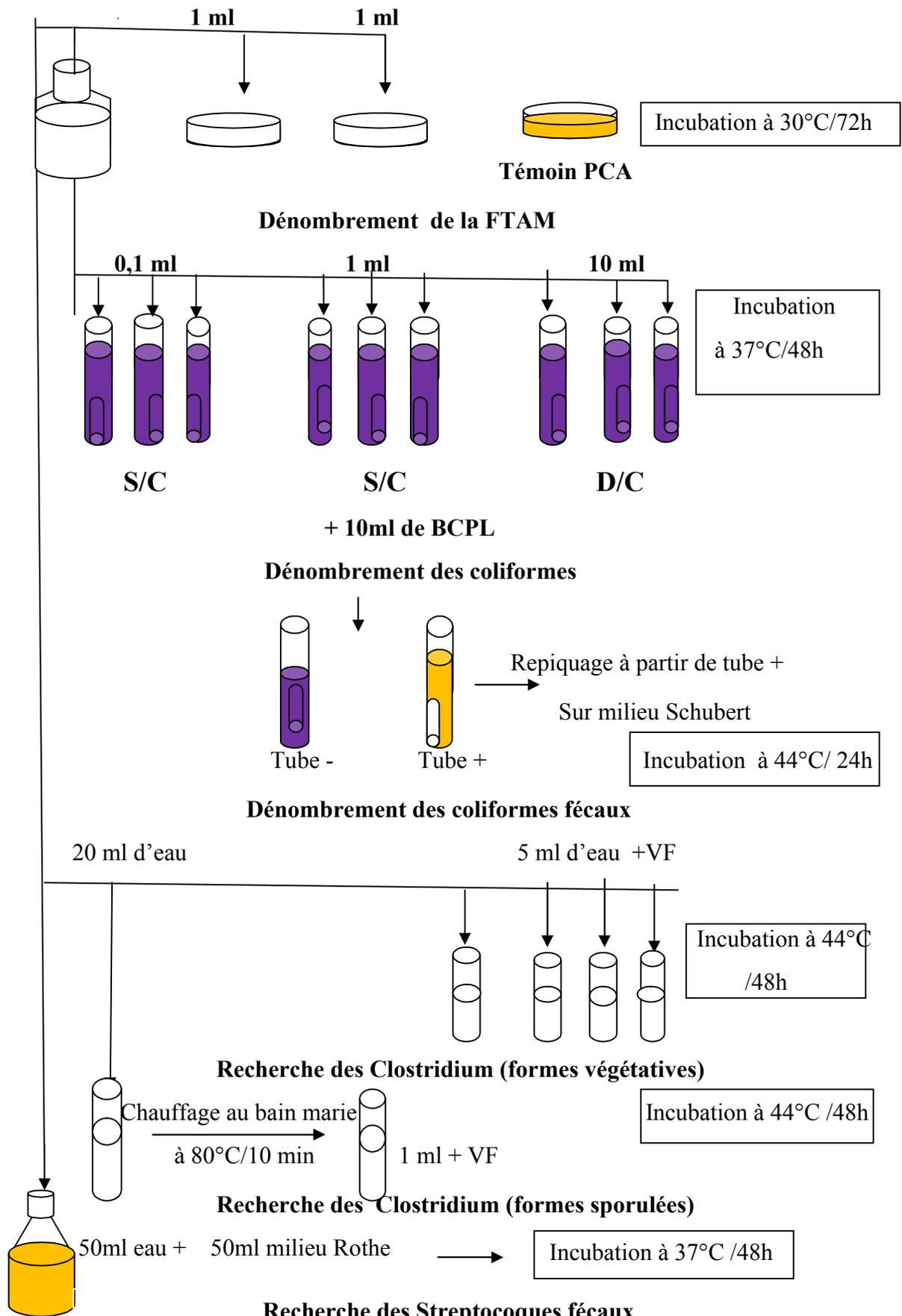


Figure 05 : Analyses effectuées sur l'eau de ville.

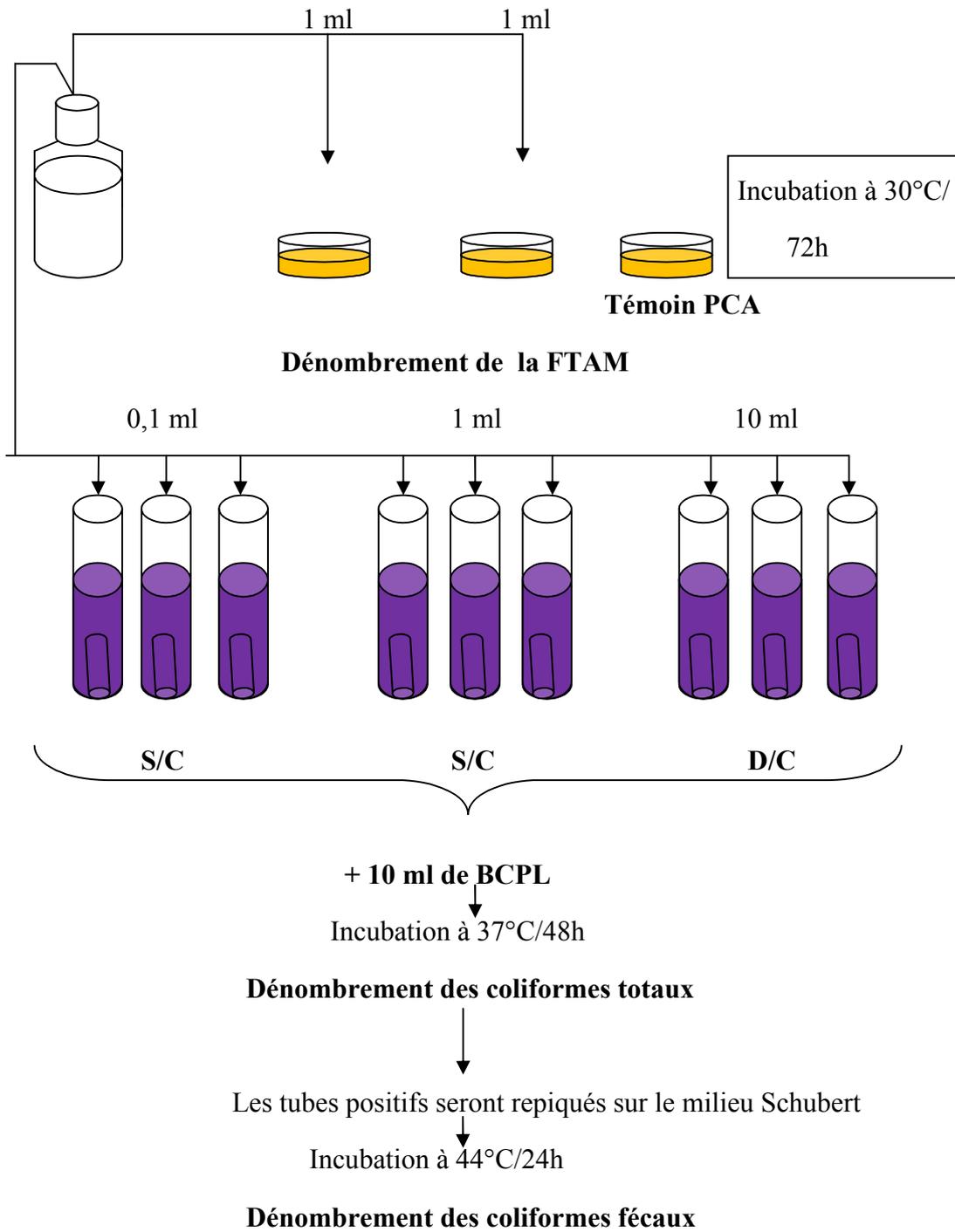
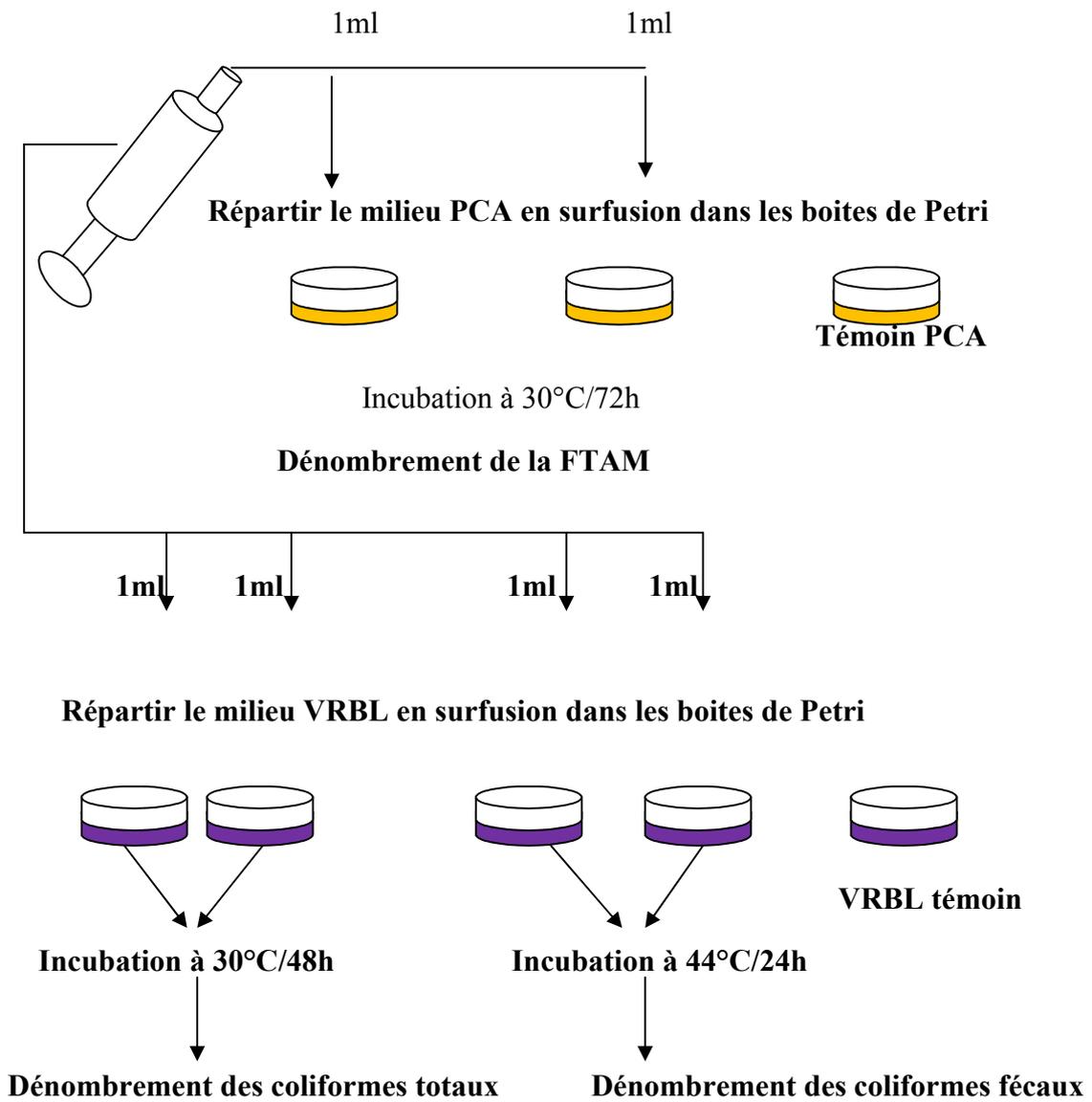


Figure n°06 : Analyses effectuées sur l'eau de process.



**Figure n°07 :** Analyses effectuées sur le lait pasteurisé.

**Tableau X : Mélange réactionnel à mettre en œuvre en fonction du nombre de test à réaliser**

Nombre de test à réaliser		20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
<b>Mélange A (en µl)</b>	<b>Eau stérile</b>	960	1440	1920	2400	2880	3360	3840	4320	4800	5280	5760	6240	6720	7200	7680	8160	8640	9120	9600
	<b>soit</b>	-	2x 720	2x 960	3x 800	3x 960	4x 840	4x 960	6x 720	5x 960	6x 880	6x 960	8x 780	7x 960	8x 900	8x 960	12x 680	9x 960	12x 760	10x 960
	<b>Marqueur 1</b>	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	<b>Marqueur 2</b>	30	45	60	75	90	105	120	135	150	165	180	195	210	225	240	255	270	285	300
<b>Mélange B (en µl)</b>	<b>Eau stérile</b>	890	1335	1780	2225	2670	3115	3560	4005	4450	4895	5340	5785	6230	6675	7120	7565	8010	8455	8900
	<b>soit</b>	-	3x 445	2x 890	5x 445	3x 890	7x 445	4x 890	9x 445	5x 890	5x 980	6x 890	5x 1000 +1x 785	7x 890	6x 100+ 1x 675	8x 890	7x1000 +1x 565	9x 890	8x 1000 +1x 445	10x 890
	<b>Inducteur</b>	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390	420	450	480	510	540	570	600
	<b>Marqueur 3</b>	50	75	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350	375	400	425	450	475	500

Kit flore totale lait et jus de fruit clair (Edition : Métis. Biotechnologie)

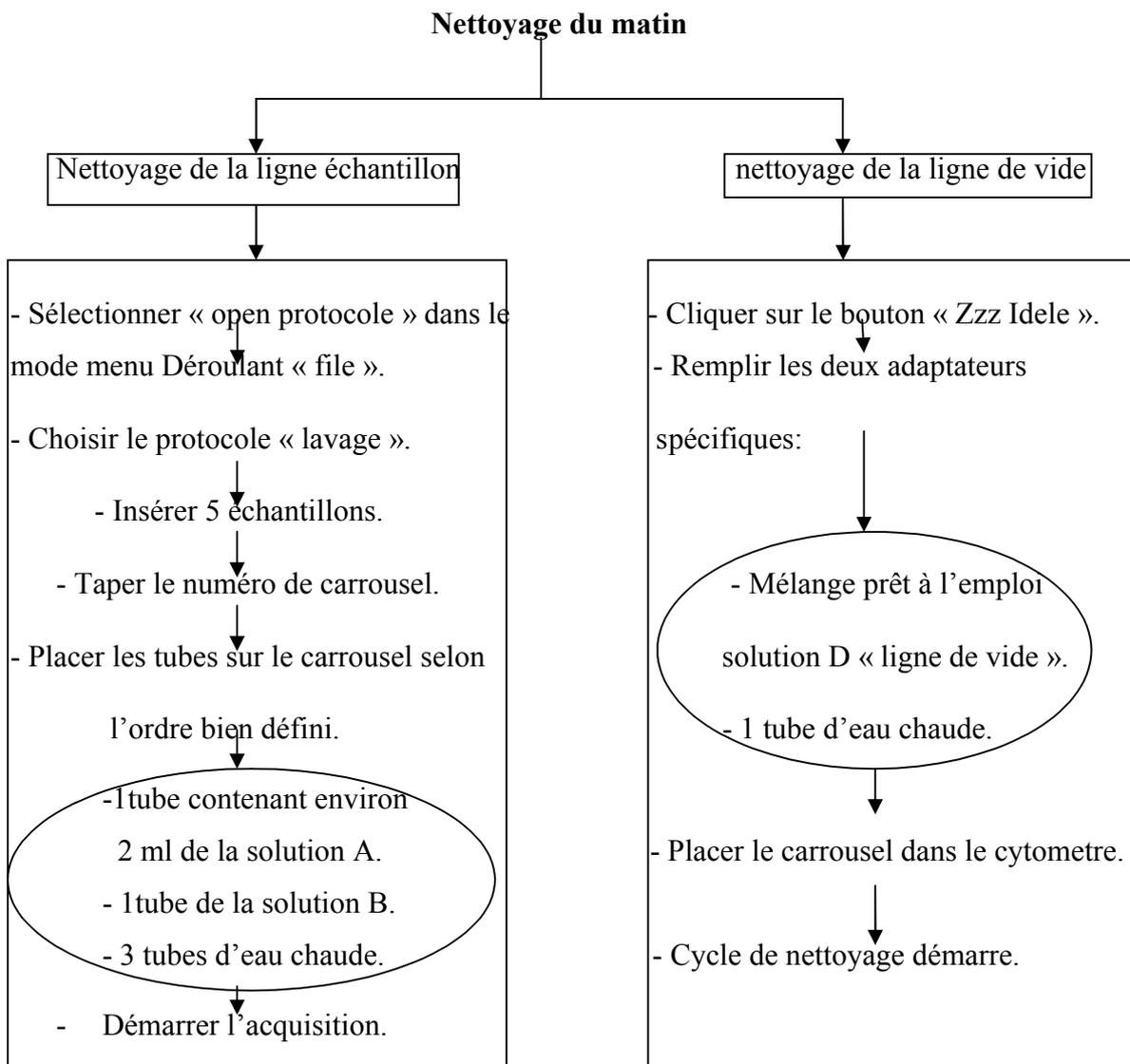


Figure n°12 : Nettoyage du matin.

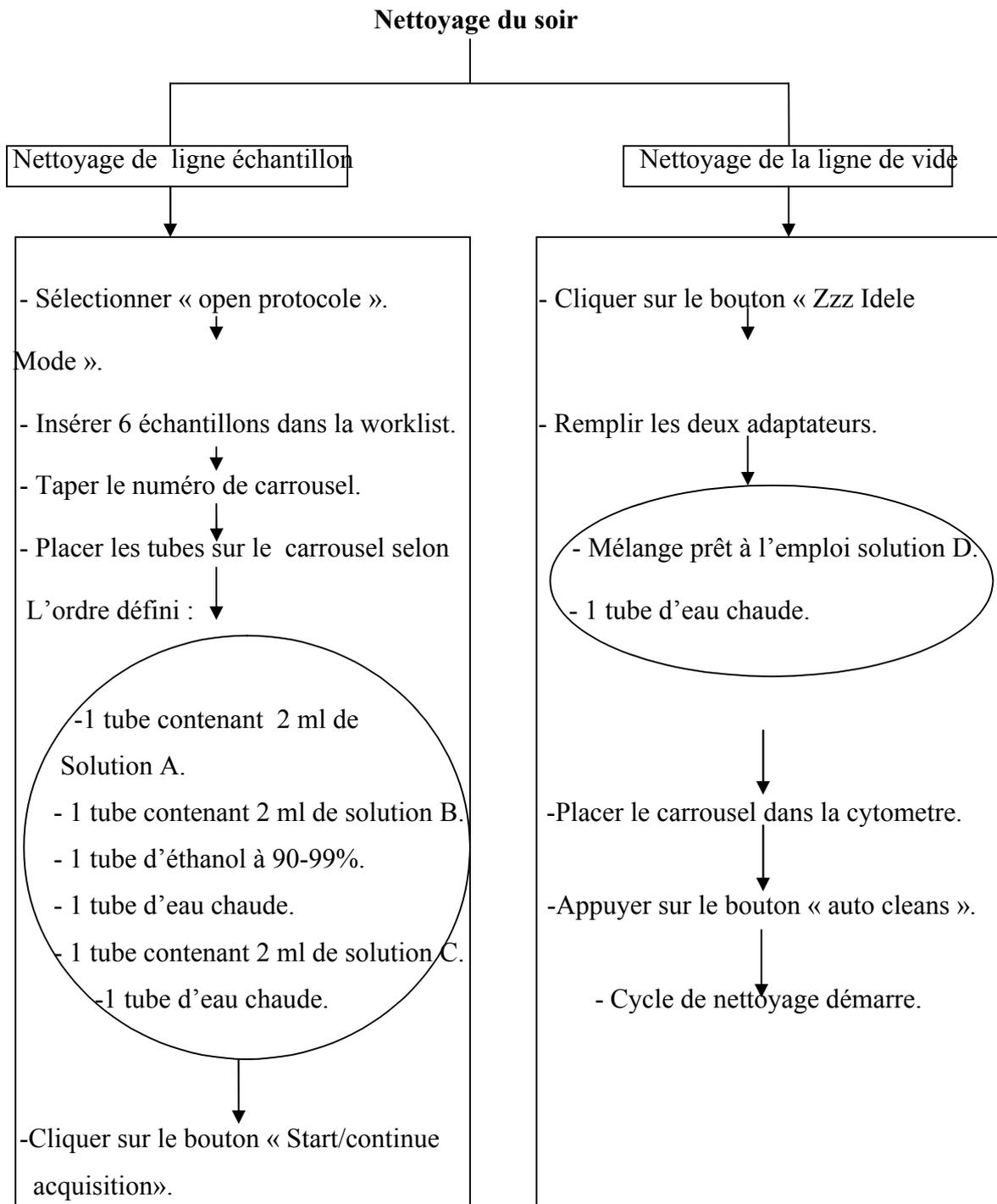


Figure n°13: Nettoyage du soir.

**Tableau IX** : Résultats d'analyses microbiologiques des poudres de lait (à 0 et 26% MG).

	26% MG		0% MG		Norme
	Lot n° (E1)	Lot n° (E2)	Lot n° (E3)	Lot n° (E4)	
DA	14/05/2012		25/04/2012		
DP	31/04/2012	29/11/2011	24/12/2011	25/01/2012	
DLC	31/07/2013	29/05/2013	23/06/2013	25/07/2013	
Provenance	France		France		
FTAM	$3,5 \cdot 10^3$	$3 \cdot 10^3$	$10^3$	$5 \cdot 10^2$	$2 \cdot 10^5$ UFC/ml (JORA N°19, 2000)
CT	Absence	Absence	Absence	Absence	1/0,1ml (JORA N°19, 2000)
CF	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence (JORA N°19, 2000)
CSR	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence (JORA N° 19, 2000)

DA : date d'analyse.

DLC : date limite de consommation

DP : départ production

E : échantillon

n : nombre d'unités de l'échantillon.

**Tableau X:** Résultats d'analyses microbiologiques de l'eau de ville et de l'eau de process.

Date d'analyse : 08/05/2012

	Eau de ville	Eau de process	Norme (JORA N°35, 1998)
<b>FTAM</b>	Absence	Absence	10 <sup>2</sup> UFC/ml
<b>CT</b>	Absence	Absence	1UFC/ml
<b>CF</b>	Absence	Absence	Absence
<b>Streptocoques D</b>	Absence		Absence
<b>C.S.R</b>	Absence		Absence

**Tableau XI:** Résultats d'analyses microbiologiques du lait pasteurisé.

Echantillon	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	FTAM
TT <sub>1</sub> (lot n°MAI33)	Absence	Absence	1,08.10 <sup>2</sup> UFC/ml
TT <sub>2</sub> (lot n°MAI36)	Absence	Absence	1,02.10 <sup>3</sup> UFC/ml
TT <sub>3</sub> (lot n°MAI37)	Absence	Absence	4.10UFC/ ml

**Tableau XII :** Résultats de dénombrement de la FTAM dans le lait pasteurisé et le lait stérilisé.

Echantillons	N <sub>0</sub>	N	Taux de réduction (%)	Norme JORA N°35 1998
A Lot n° MAI 33	1,08 10 <sup>2</sup>	0	100%	<10 UFC/0,1 ml
B Lot n° MAI36	1,02 10 <sup>3</sup>	0	100%	<10 UFC/0,1 ml
C Lot n° MAI37	4 .10	0	100%	<10 UFC/0,1 ml

N<sub>0</sub> : nombre de germes (UFC/ml) après la pasteurisation.

N : nombre de germes (UFC/ml) survivant après la stérilisation.

Tableau XIII: Résultats d'analyses microbiologiques effectuées sur le produit fini.

	Brique 1	Brique 2	Brique 3	Brique 4	Brique 5	<b>Normes (JORA N°35, 1998)</b>
Lot n° MAI 33 DP : 03/05/2012 DLC : 03/07/2012						
Heure de prélèvement	16h30	17h31	17h51	18h03	18h31	
Lot n° MAI36 DP : 03/05/2012 DLC : 03/07/2012						
Heure de prélèvement	00h58	01H39	02h11	02h35	03h04	
Lot n° MAI37 DP : 04/05/2012 DLC : 04/07/2012						
Heure de prélèvement	03h12	03h44	04h04	04h25	04h49	
FTAM	Absence					<10 UFC/0,1ml

Tableau XIV: Résultat d'analyses effectuées par le test à la résazurine.

	Lot n° MAI 33 A	Lot n° MAI 36 B	Lot n° MAI 37 C
Brique 1	Bleu	Bleu	Bleu
Brique 2	Bleu	Bleu	Bleu
Brique 3	Bleu	Bleu	Bleu
Brique 4	Bleu	Bleu	Bleu
Brique 5	Bleu	Bleu	Bleu

**Tableau XV** : Résultats d'analyses effectuées par la cytométrie en flux.

	Lot n° MAI 33	Lot n° MAI 36	Lot n° MAI 37
Brique 1	Absence	Absence	Absence
Brique 2	Absence	Absence	Absence
Brique 3	Absence	Absence	Absence
Brique 4	Absence	Absence	Absence
Brique 5	Absence	Absence	Absence

## Résumé

Dans un contexte général où la demande du consommateur de lait UHT s'oriente toujours vers des produits innovants et de qualité, les industriels doivent assurer l'innocuité de leurs produits. Les contrôles microbiologiques des produits s'avèrent indispensables pour la maîtrise de la qualité alimentaire et hygiénique.

L'objectif de notre étude effectuée au sein de la laiterie Tchén Lait Candia est l'estimation de la fiabilité et de la rapidité des trois techniques d'analyse (la méthode classique, test à la résazurine, et cytométrie en flux).

L'analyse classique permet le dénombrement de la charge microbienne du produit, elle, reste encore indispensable mais il faut disposer des méthodes rapides fiables reproductibles et si possible simples et peu coûteuses. La cytométrie en flux et la résazurine, sont des méthodes alternatives et complémentaires.

La résazurine permet de mesurer la densité bactérienne qui sera révélée par un changement de couleur, la cytométrie en flux permet de réaliser des tests quantitatifs par numération directe des microorganismes et qualitative par la caractérisation de la particule détectée.

Les résultats obtenus ont montré l'utilisation de ces trois méthodes que le lait UHT produit par cette unité est stérile et conforme aux normes algériennes en vigueur.

**Mots clés :** lait UHT, traitement thermique, pasteurisation, stérilisation UHT, process, méthode classique, test à la résazurine, cytométrie en flux.

## Abstract

In a general context where consumer demand for UHT milk towards continued product innovation and quality, manufacturers must ensure the safety of their products. Microbiological testing of products is essential for mastering the quality of food and hygiene.

The aim of our study within the dairy milk Tchén / Candia is the estimate of the reliability and speed of the three analytical techniques (conventional method, the resazurin test, and flow cytometry).

The standard analysis allows the enumeration of the microbial load of the product, she is still essential but requires rapid methods reliable and reproducible if possible simple and inexpensive. The flow cytometry and resazurin are alternative and complementary methods.

Resazurin measures bacterial density that will be revealed by a color change, the flow cytometry allows for quantitative tests by direct enumeration of microorganisms and qualitative characterization of the detected particle.

The results of the use of these three methods showed that UHT milk produced by this Unit is sterile and in force Algerian standard.

**Key words:** UHT milk, heat treatment, pasteurization, UHT sterilization, process, conventional method, the resazurin assay, flow cytometry.