

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Sciences Biologiques  
**Spécialité/Option :** Microbiologie Appliquée  
**Département :** Ecologie et Génie de l'Environnement

---

**Thème : Qualité microbiologique des crèmes glacées commercialisées dans la ville de Guelma et étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées**

---

**Présenté par :**

- BOUGUERRA Maroua
- LAOUIER Nor El Houda

**Devant la commission composée de :**

Dr. BOUSSADIA Imene Meriem (MCB)	<b>Président</b>	Université de Guelma
Pr. HOUHAMDI Moussa	<b>Encadreur</b>	Université de Guelma
Dr. TORCHE Asma (MCB)	<b>Examineur</b>	Université de Guelma

**Juillet 2019**

## *Remerciements*

*Nous remercions Allah, Dieu le Miséricordieux qui nous a éclairé la voix de la science et de la connaissance et par sa grâce on a réussi à achever ce travail.*

*On exprime notre profonde gratitude à **M. Houhamdi Moussa**, professeur à L'Université 8 Mai 1945 Guelma qui nous a fait l'honneur d'avoir veillé et dirigé ce travail. Nous avons eu le privilège de bénéficier de son enseignement, de son savoir et de ses conseils pertinents.*

*Nous remercions également les membres du jury : **Dr. Boussadia Imene Meriem** et **Dr. Torche Asma**, Maitres de Conférences à l'Université 8 Mai 1945 Guelma pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nous remercions aussi toute l'équipe de laboratoire de la DSP précisément :*

*Le directeur de la **DSP Guelma** pour nous avoir acceptées au niveau de son établissement.*

***M. Girradi Abd-Rahman** responsable du laboratoire pour ces explications très enrichissantes.*

*Tout le personnel du laboratoire de la **DSP** pour nous avoir accueillies les bras ouverts, en fait vivre pendant deux mois une expérience humaine et professionnelle inoubliable.*

*Nos remerciements s'adressent aussi à **Dr. Harridi Fatma Zohra** pour l'aide qui nous a apporté. Sans oublier **Mme. Abbas Leila**, Ingénieur du laboratoire Biologie, Eau et Environnement (LBEE, Université 8 Mai 1945 Guelma), pour sa précieuse aide pour la réalisation de ce travail.*

*Nous ne terminerons pas ces mots sans gratifier de nos vifs remerciements à toutes les personnes qui nous ont soutenu moralement et nous ont apporté un plus par leurs actif,*

*Merci encore et encore ...*

## Dédicaces

Nous dédions cet humble et modeste travail fait avec grand amour, sincérité et fierté à :

Nos chers parents, nous ne pourrions jamais exprimer notre amour envers vous. Vos prières, vos encouragements et votre soutien nous ont toujours été d'un grand secours. Puisse Dieu, le tout puissant vous préserver du mal, vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

Nos chers professeurs, nous vous remercions d'avoir enrichi nos connaissances et de nous avoir guidés durant toutes ces années.

Tous les membres de nos familles.

Toute la promotion 2019 et tous ceux qui nous aiment

Maroua et Nor

## Liste des figures

<b>Fig.1.</b> Structure de la crème glacée.....	2
<b>Fig.2.</b> Formulation type d'une crème glacée .....	5
<b>Fig.3.</b> Phénomènes observés à l'interface gaz/liquide.....	13
<b>Fig.4.</b> Machine pour la fabrication de crèmes glacées.....	14

## Liste des photos

<b>Photo. 1.</b> Aspet morphologique du <i>Salmonella typhimurium</i> en microscope électronique.....	19
<b>Photo. 2.</b> Aspect morphologique du <i>S. aureus</i> en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000).....	20
<b>Photo. 3.</b> <i>L. monocytogenes</i> sur microscopie électronique.....	21
<b>Photo. 4.</b> Préparation de la solution mère $10^{-1}$ .....	26
<b>Photo. 5.</b> Les solutions mères.....	27
<b>Photo. 6.</b> Aspect du chapman après incubation.....	31
<b>Photo. 7.</b> Aspect du test catalase positive.....	33
<b>Photo. 8.</b> Aspect du test coagulase positive.....	33
<b>Photo. 9.</b> Aspect du test coagulase négatif.....	33
<b>Photo. 10.</b> La galerie API 20 E.....	36
<b>Photo. 11.</b> Enrichissement à partir du milieu SFB.....	37
<b>Photo. 12.</b> Gélose SS avant incubation.....	37
<b>Photo. 13.</b> Gélose SS après incubation (Présence de <i>Salmonella</i> ).....	37
<b>Photo. 14.</b> Gélose au sang avant incubation.....	39
<b>Photo. 15.</b> Gélose au sang après incubation (Présence de <i>Listeria</i> ).....	39
<b>Photo. 16.</b> Disposition des antibiotiques sur les boîtes MH.....	40
<b>Photo. 17.</b> Aspect des Cocci Gram+ (grappe des raisins).....	46
<b>Photo. 18.</b> Aspect des Cocci Gram+ (grappe des raisins).....	46
<b>Photo. 19.</b> Aspect des bacilles Gram -.....	46
<b>Photo. 20.</b> Résultat du test TSI.....	47
<b>Photo. 21.</b> Résultat du test catalase.....	48
<b>Photo. 22.</b> Résultat du test coagulase avec le tube témoin.....	48
<b>Photo. 23.</b> Résultats des profils biochimiques des entérobactéries.....	50
<b>Photo. 24.</b> Résultats des profils biochimiques des Staphylocoques.....	51

**Photo. 25.** Résultats des antibiogrammes..... 53

## Liste des tableaux

<b>Tab.1.</b> Fabrication de la crème glacée.....	12
<b>Tab.2.</b> Résumé des méthodes d'analyse bactériologique utilisées.....	29
<b>Tab.3.</b> Les antibiotiques utilisés.....	39
<b>Tab.4.</b> Résultat de lecture macroscopique des échantillons n° 3, 5, 6, 7, 9 et 11.....	42
<b>Tab.5.</b> Résultat du dénombrement des différentes flores bactériennes (UFC/mL).....	44
<b>Tab.6.</b> Niveau de contamination par les germes totaux.....	45
<b>Tab.7.</b> Niveau de contamination par les entérobactéries.....	45
<b>Tab.8.</b> Niveau de contamination par les staphylocoques.....	45
<b>Tab.9.</b> Résultat de la coloration de Gram.....	46
<b>Tab.10.</b> Résultat du test TSI.....	47
<b>Tab.11.</b> Résultat du test catalase.....	48
<b>Tab.12.</b> Résultat du test coagulase.....	48
<b>Tab.13.</b> Résultats des plaques API 20 E des dix souches sélectionnées.....	49
<b>Tab.14.</b> Résultat de la galerie API 20 E.....	49
<b>Tab.15.</b> Résultats des plaques API Staph, des quatre souches sélectionnées.....	50
<b>Tab.16.</b> Résultat de la galerie API Staph.....	51
<b>Tab.17.</b> Résultat de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques.....	52

## Liste des abréviations

**FMAR** : Flore Mésophile Aérobie Revivable

**GT** : Germes Totaux.

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

**ONPG**: Ortho Nitro Phénol Galactopyranosidase.

**UFC** : Unité Formant Colonies.

**TIA** : Toxi-Intoxications Alimentaires

**ESDL** : Extrait sec dégraissé lactique

**IQF** : Individual Quick Freezing

**FMAR** : Flore Mésophile Aérobie Revivable

**PAM** : Aliments Prêts-à-Manger

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**TIAC** : Toxi-Infections Alimentaires Collectives

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**DSP** : Direction de la Santé et de la Population

**EPS** : Eau Physiologique Stérile.

**SM** : Solution Mère

**SCN** : *Staphylococcus* à Coagulase Négatif

**API** : Analytical Profile Index

**SFB** : Bouillon au Sélénite

**TSI** : Triple Sugar Iron Agar

**LDC** : Lysine Décarboxylase

**TSE** : Tryptone-sel

**HACCP** : Hazard Analysis Critical Control Point

**SS** : Gélose *Salmonella Shigella*

**GN** : Gélose Nutritive

**MH** : Gélose Mueller-Hinton

**AMC** : Amoxicilline

**C** : Chloramphénicol

**CEP** : Ciprofloxacine

**CFM** : Céfixime

**CRO** : Ceftriaxone

**AMP** : Ampicilline

**HLG** : Gentamicine

**NO** : Nitrofurantoïne

**OX** : Oxacilline

**P** : Pénicilline

**PC** : Pipéracilline

# Introduction

### Introduction

La crème glacée gagne une importance toujours croissante en tant que produit laitier. Sa popularité auprès du consommateur s'explique par ses qualités rafraîchissantes et sa grande valeur nutritive, et auprès du fabricant par les bénéfices qu'offre ce produit rationnellement fait. En outre, le producteur sera satisfait de voir s'ouvrir de nouveaux marchés pour son lait **(Kruijer, 1954)**.

Les crèmes glacées sont des préparations obtenues à la base, par la congélation d'un mélange de lait, de crème, de sucre et de goût. Ce sont des aliments agréables au goût et nutritifs mais, elles constituent un milieu très favorable à la prolifération microbienne en raison de leur valeur nutritive élevée (lactose, protéines... etc.) et de leur pH presque neutre (pH~6-7). Plusieurs cas d'intoxications alimentaires (TIA) liés à la contamination des produits glacés par *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* ont été enregistrés en Asie, en Europe et en Amérique **(El Ouali Alami et al., 2013)**.

Toutefois, les maladies d'origine alimentaire sont l'un des problèmes de santé publique les plus communs ; elles créent un fardeau social et économique ainsi que des souffrances humaines et posent un problème auquel tous les pays sont confrontés **(Brisabois et al., 1997)**. Devant le risque sanitaire lié à la consommation de ces crèmes glacées un suivi de la qualité microbiologique de ces aliments s'impose afin d'éviter la survenue de TIA qui peuvent avoir des conséquences dramatiques sur la santé des consommateurs.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la qualité microbiologique des crèmes glacées commercialisées dans la ville de Guelma et d'étudier le profil de résistance aux antibiotiques des bactéries isolées. Dans ce contexte, notre étude se compose de deux parties interdépendantes.

1. Une synthèse bibliographique comportant deux chapitres : Le premier expose des généralités sur la crème glacée et le second résume la microbiologie de ces produits alimentaires, soit les microorganismes de ces aliments et le risque sanitaire lié à leur consommation et décrit quelques méthodes préventives pour réduire les risques de toxoinfection alimentaires.
2. Une partie expérimentale citant la méthodologie élaborée durant notre étude et suivi par l'exposé des résultats obtenus et de leurs interprétations et discussions, une conclusion et des perspectives clôturent cette étude.

# Synthèse bibliographique

# Chapitre I

## Généralités sur les crèmes glacées

### I. Définition de la glace de consommation :

La glace peut être décrite comme un mélange d'environ 60% d'eau et 40% de composants secs. Seuls 2/3 des liquides sont gelés, le reste se trouvant à l'état libre, dilué ou lié (1/3). En plus, l'air constitue également un élément important (**Declercq et Vlegels, 2007**). La consommation de crèmes glacées est maximale à la belle saison. La demande est très saisonnière (généralement de mai à septembre) (**Dudez et al., 2017**).

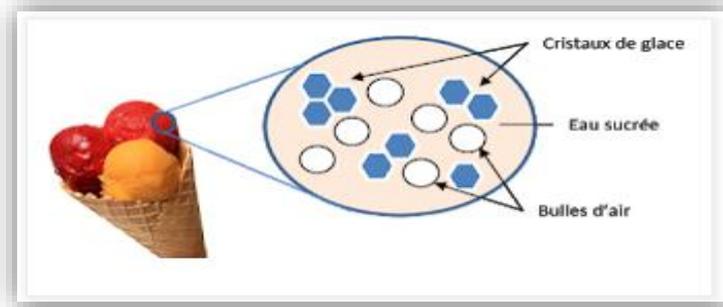


Figure 1. Structure de la crème glacée (**Dudez et al., 2017**).

### II. Types de glaces :

L'association de composants lactés de matière grasse laitière, de sucres et de l'eau, combinée à d'autres ingrédients autorisés, détermine le nom de cinq sortes de glaces : glace à eau, lait glacé, la glace, le sorbet et la crème glacée (**Declercq et Vlegels, 2007**).

#### 1. Glace à l'eau :

Cette glace n'est soumise à aucune prescription minimale en dehors des conditions d'hygiène (**Declercq et Vlegels, 2007**).

#### 2. Lait glacé :

Il s'agit d'un produit congelé obtenu à partir d'une combinaison de produits laitiers, de sucre et d'un ou plusieurs autres ingrédients similaires à ceux couramment utilisés dans la fabrication des glaces. Il est fait pour contenir une teneur en matières grasses laitières supérieure à celle qui est spécifiée par la loi pour les sorbets et que celle nécessaire pour la crème glacée (**NIIR Board of Consultants and Engineers, 2005**).

#### 3. La glace :

La dénomination de la glace s'applique aux produits contenant d'autres graisses que celle du lait, par exemple du lait d'amande ou de la graisse de coco, ou lorsque les prescriptions

minimales de la crème glacée et de la glace au lait ne sont pas respectées (**Declercq et Vlegels, 2007**).

#### 4. Le sorbet :

Il est constitué d'eau, de sucre et d'une quantité importante de fruit (qui peuvent être remplacés par certains alcool ou herbes aromatiques). Le sorbet est donc plus léger que les glaces et crème glacée mais il faut savoir que son apport nutritionnel est aussi nettement moindre [1].

#### 5. La crème glacée :

C'est une glace à laquelle on ajoute de la crème alors que le mélange commence à prendre. Cette étape lui donne alors une texture plus onctueuse et donc une contenance plus importante en produits laitiers [1].

La crème glacée s'accommode de multiples aromatisations et permet la valorisation des produits de la ferme : lait, crème, beurre, œufs, miel, fruits frais ou sec (**Dudez et al., 2017**). Des ingrédients fonctionnels, tels que les stabilisants et les émulsifiants, sont souvent inclus dans le produit pour favoriser une texture appropriée et améliorer la saveur (**Alvarez, 2009**).

##### 5.1. Historique :

Les glaces sont des préparations alimentaires relativement ancestrales qui ont connu une évolution parallèle à celle de l'utilisation du froid par les hommes. Pendant plusieurs siècles, durant l'ère du froid naturel, c'est la neige et la glace qui furent mélangées à des fruits, du miel, de l'eau de rose...etc. C'est semble-t-il sous le règne de l'empereur Néron en l'an 52 (**Boutonnier, 2001**). En l'an 1292, Marco Polo, de retour de son périple asiatique, rapporte les premières recettes de glaces refroidies par ruissellement sur le récipient contenant le mélange à glacer, d'eau additionnée de salpêtre. En 1530, c'est un Sicilien qui met en pratique les découvertes chinoises, d'où la revendication des « gelati » par les Italiens. Au XVIIe siècle Gérard Tirsain, grand cuisinier français au service de Charles I<sup>er</sup>, roi d'Angleterre, a l'idée d'ajouter à ses glaces du lait et de la crème. En 1673, on recense à Paris pas moins de 250 glaciers et la vogue s'étend à différentes grandes villes européennes. En 1785, Bonaparte, grand amateur de glaces, fréquente le célèbre café PROCOPE à Paris qui compte plus de quatre-vingts variétés de glaces et de sorbets. Produits réservés au départ à la cour des rois, puis à la noblesse, la révolution aidant, la glace peu à peu se démocratise. En 1846, une ménagère américaine, Nancy Johnson, invente l'une des premières machines à glace à manivelle baptisée sorbetière, tandis que Jacob Fussel en 1857 crée le premier atelier de fabrication de crèmes glacées à

Baltimore. La véritable première grande usine de crèmes glacées au monde est lancée aux USA en 1864 sous le nom de Horton Ice Cream and Co (**Boutonnier, 2001**).

En 1870, l'Allemand Karl Von Linde met au point un compresseur frigorifique, suivi en 1880 par le Français Ferdinand Carre, qui lui, découvre le principe de la production de froid par vaporisation de l'ammoniaque.

En 1921, un glacier de l'Iowa lance le premier chocolat glacé qu'Harry Bust présente sur bâtonnet à partir de 1923. Le freezer réfrigéré par compression et expansion d'ammoniaque dans la chemise du cylindre de congélation, ramène la durée de congélation à 5 ou 6 min. C'est en 1924, qu'en France s'ouvre la première usine de crème glacée de conception américaine, et le freezer continu révolutionne l'industrie de la crème glacée. Le premier décret définissant les glaces, crèmes glacées et sorbets est promulgué en France en 1937, et le 1er janvier 1996, les industriels glaciers publient le premier guide européen des bonnes pratiques définissant notamment la composition des produits, c'est le code Euroglaces. En 1999, un équipementier allemand commercialise un extrudeur de crème glacée à basse température qui permet de ce fait de supprimer le tunnel de surgélation (**Boutonnier, 2001**).

Aujourd'hui, on peut trouver de la crème glacée dans presque tous les restaurants et dépanneurs. Les supermarchés en offrent une très grande variété et c'est sans compter les comptoirs laitiers spécialisés ! On peut même fabriquer de la crème glacée soi-même à la maison à l'aide d'une sorbetière, que l'on trouve facilement dans les grands magasins. [2].

### **5.2. Composition et mode de fabrication des glaces :**

#### **5.2.1. Composition :**

Les crèmes glacées sont composées d'un mélange d'ingrédients congelés parmi lesquels le lait, le sucre et/ou des produits sucrants, des hydrocolloïdes, des émulsifiants et des produits aromatisants [3].

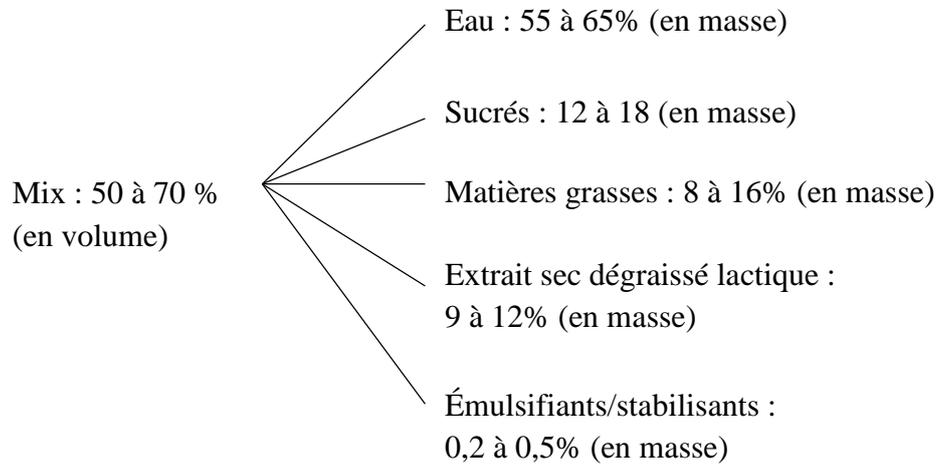
#### **5.2.2. Grandes règles de la formulation :**

Le raisonnement consiste, dans un premier temps, à fixer les objectifs recherchés pour chaque type de produit fini, puis dans un deuxième temps à traduire ces objectifs en caractéristiques pour le mix à préparer (mélange dans le jargon professionnel) et enfin dans un troisième temps à sélectionner les ingrédients à mettre en œuvre en fonction du cahier des charges (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 5.2.3. Formulation type (cas d'une crème glacée) :

Les crèmes glacées sont composées d'air et de mix qui se compose principalement d'eau, de sucre, de matières grasses, d'extrait sec dégraissé lactique et émulsifiants/stabilisant.

Air : 30 à 50 % (en volume)



**Figure 2.** Formulation type d'une crème glacée (Boutonnier, 2001).

### 5.2.4. Principaux composants de l'extrait sec des glaces :

#### 5.2.4.1. Extrait sec dégraissé lactique (ESDL) :

L'ESDL peut provenir de différentes sources telles que du lait frais, du lait concentré en matière sèche ou du lait en poudre. On a également recours à d'autres poudres dans l'industrie des produits laitiers glacés, comme les poudres de lactosérum ou de babeurre. Dans le but de réduire les coûts des matières tout en améliorant les fonctionnalités des constituants laitiers, l'emploi de lacto-remplaceurs qui incorporent des poudres lactières modifiées s'est généralisé à l'échelle industrielle (Lapointe-Vignola, 2002).

Les principaux intérêts de l'ESDL dans les crèmes glacées résident dans l'apport de protéines et de minéraux bénéfiques pour la structure de la crème glacée et par conséquent pour sa texture. En outre, l'apport de lactose représente une source d'extrait sec peu onéreuse. En revanche, chacun de ces constituants présente des limites, notamment au niveau des protéines (risques de goût de cuit ou d'amertume), au niveau des minéraux (risques de goût salé en cas d'excès de poudre de lactosérum) et ainsi qu'au niveau du lactose (risques de cristallisation du lactose peu soluble dans l'eau avec apparition d'une texture sableuse) (Lapointe-Vignola, 2002).

### 5.2.4.2. Matière grasse :

En ce qui concerne les crèmes glacées, la matière grasse est exclusivement d'origine laitière. On peut l'incorporer par le biais de crème fraîche, de beurre ou encore de beurres concentrés (**Lapointe-Vignola, 2002**).

Certaines formulations incorporent depuis quelques années des matières grasses végétales, qui peuvent être soit des graisses végétales, soit des huiles partiellement hydrogénées. Cette tendance qui vise à réduire les coûts matières interdit la dénomination « crème glacée » qui est alors remplacée par la dénomination « dessert glacé » (**Boutonnier, 2001**).

La présence de matière grasse dans une crème glacée présente de nombreux avantages tels que la réduction de la vitesse de foisonnement, la stabilisation de la mousse, l'amélioration de la texture, du corps et de la saveur du produit fini, ainsi que l'accroissement de sa valeur énergétique (**Lapointe-Vignola, 2002**).

Par contre, trois inconvénients majeurs limitent son taux d'incorporation. Tout d'abord, la matière grasse étant un composé antimoussant, et à viscosité élevée, sa présence réduit le taux de foisonnement du mélange (**Lapointe-Vignola, 2002**).

Ensuite une augmentation de matière grasse diminue d'autant la teneur en ESDL, afin de respecter l'extrait sec total de la formulation. Enfin, un pourcentage excessif de matière grasse peut entraîner une texture pâteuse voire collante (**Boutonnier, 2001**).

### 5.2.4.3. Sucres :

Les glaces, étant des produits consommés en fin de repas ou durant l'après-midi, sont des aliments par excellence sucrés. En outre, les sucres représentent une source d'extrait sec peu onéreuse. Enfin, ils jouent un rôle très important sur la quantité d'eau liée c'est-à-dire non disponible pour la congélation. Autrement dit, la nature et les doses des sucres apportés dans la formulation vont influencer de manière prépondérante la stabilité thermique de la glace et sa vitesse de fonte à la sortie du congélateur. En contrepartie, ils limitent le taux de foisonnement du mix, et ils peuvent en cas de dosage important générer une texture collante en bouche et entraîner une cristallisation excessive et grossière (**Boutonnier, 2001**).

## 5.2.5. Deux constituants fondamentaux de glaces :

### 5.2.5.1. Air :

L'air, qui est incorporé à débit variable dans le mix, a été préalablement filtré. Il remplit plusieurs rôles principaux dans les glaces. C'est ainsi que lorsque le taux de foisonnement augmente, on constate une réduction de la taille des cristaux de glace et des bulles d'air, ce qui

contribue à une amélioration de la texture du produit fini. La présence d'air dans les glaces permet d'alléger la valeur énergétique de celles-ci, de même que leur prix de revient. C'est la raison pour laquelle la glace est un des rares produits alimentaires solides vendus au litre. L'air étant un isolant thermique, il confère à la glace une meilleure résistance à la fonte lors d'une élévation de température et procure une moindre sensation de froid, qui est désagréable lors de la dégustation. Enfin, il faut souligner car, c'est remarquable, que les crèmes glacées ou les sorbets sont les seuls produits surgelés que l'on peut mettre en œuvre, tant au niveau industriel (fromage par extrusion) qu'au niveau ménager (réalisation de tranches et de boules), à une température négative et que l'on peut consommer sans décongélation préalable. Cela dit, si l'incorporation d'air dans le mix est aisée avec les appareils continus, sa stabilité dans la glace est assujettie à la présence dans le mélange de composants à fort pouvoir moussant et ce d'autant plus que la crème glacée est riche en matière grasse, dont le rôle anti-mousse n'est plus à démontrer. C'est la raison pour laquelle les glaces à l'eau qui n'incorporent pas d'agents moussants dans leur formulation ont un taux de foisonnement relativement faible de l'ordre de 25 à 30 %, tandis que certains produits peuvent atteindre voire dépasser le taux de foisonnement légal fixé à 2 (**Boutonnier, 2001**).

### **5.2.5.2. Eau :**

Celle-ci est également indispensable, car son rôle de solvant permet à l'eau de solubiliser l'extrait sec dégraissé lactique ainsi que les sucres, ensuite son rôle de dispersant facilite l'émulsification de la matière grasse. En outre, son passage partiel de l'état liquide à l'état solide et la création de réseaux solides cristallins permet une stabilisation de la structure physico-chimique complexe des glaces. Par ailleurs, elle doit être d'excellente qualité bactériologique afin de ne pas véhiculer de germes microbiens. Néanmoins, une quantité d'eau excessive dans le mix va affecter de manière significative, à la fois la qualité organoleptique (sensation granuleuse due à une taille importante de cristaux de glace, et sensation aqueuse lors de la fonte en bouche) et la stabilité du produit fini (accélération de la vitesse de fonte en raison d'une quantité d'eau libre excessive) (**Boutonnier, 2001**).

### **5.2.6. Ingrédients utilisés en fabrication :**

#### **5.2.6.1. Ingrédients d'origine laitière :**

##### **5.2.6.1.1. Sources d'ESDL :**

Il y'a de nombreuses sources lactées. Dans l'industrie, les sources sont variables selon les cours des matières premières et les niveaux de qualité recherchés pour tel ou tel produit fini. C'est ainsi qu'on privilégie souvent le lait écrémé en poudre, et dans certains cas le lait

concerné, tout en assistant au recours, en tant que substitution partielle, à des produits élaborés que sont les lacto-remplaceurs, eux-mêmes d'origine majoritairement laitière (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### **5.2.6.1.2 Sources de matière grasse laitière**

Dans les crèmes glacées, les ingrédients cités précédemment ne suffisent pas à régler le taux de matière grasse du mélange. C'est la raison pour laquelle on tend à ajouter des matières premières concentrées en matière grasse.

Dans les unités industrielles de production de produits laitiers glacées, soit on met en œuvre du beurre frais avec toutes les contraintes que cela suppose, soit, et c'est le plus souvent le cas, on fait appel à des beurres concentrés spécialement préparés pour les glaciers (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### **5.2.6.2. Ingrédients d'origine végétale :**

#### **5.2.6.2.1. Sources de matière grasse :**

Dans les desserts glacées, il est courant de rencontrer des matières grasses végétales, d'origines diverses et parfois hydrogénées. On s'en sert pour adapter la plage de fusion et remplacer ainsi avantageusement la matière grasse butyrique plus onéreuse à l'achat. Cependant, l'ajout de matière grasse non laitière n'est pas toujours permis. C'est le cas au Canada dans les crèmes glacées et les substituts de produits laitiers glacés (**Lapointe-Vignola, 2002**).

#### **5.2.6.2.2. Sucres et édulcorants :**

Le saccharose reste le sucre majoritairement utilisé en raison de sa solubilité et de son pouvoir sucrant élevés ; par ailleurs, c'est un composant peu onéreux dans la formulation. Néanmoins, il est rarement utilisé tout seul. C'est ainsi que l'on rencontre le plus souvent des sirops de glucose qui sont issus de l'hydrolyse de solutions d'amidon. Ces derniers, outre l'apport de dextrose (le dextrose équivalent traduisant la teneur en sucres réducteurs en gramme pour 100 g de matière sèche) permettent de bénéficier des avantages de fractions comme les malto-dextrines à poids moléculaire élevé. En effet, celles-ci ont un faible pouvoir sucrant, mais en contrepartie un fort pouvoir viscosant. La quantité d'eau liée augmentant, on réduit la fraction d'eau libre disponible pour la congélation et on peut ainsi améliorer la stabilité thermique de la glace. La présence de sucres à plus faible poids moléculaire que le saccharose tels que le dextrose et le fructose ou encore le sucre inverti (inversion du sens de rotation de la lumière entre le saccharose et les deux sucres que sont le dextrose et le fructose obtenus par hydrolyse du saccharose) provoque un abaissement de la température cryoscopique

(température de congélation commençante du mix). Cet abaissement a notamment pour intérêt d'obtenir une glace plus molle à  $-18^{\circ}\text{C}$  et par conséquent plus agréable à consommer dès la sortie du congélateur, on parle de « cuillèrabilité de la crème glacée ». Certains fabricants utilisent des sirops de fructose, ou encore des édulcorants intenses dans le cas de fabrications de glaces allégées en sucre (**Boutonnier, 2001**).

### 5.2.6.2.3. Cacaos et chocolats :

Le cacao et le chocolat sont des ingrédients qu'on peut utiliser seuls ou associés dans la préparation du mélange. Tout dépend de la disponibilité du produit sur le marché et montant qu'on veut consacrer aux matières. En ce qui concerne l'enrobage des bâtonnets, des barres ou de certaines spécialités à partager, on emploie le plus souvent des mélanges obtenus par l'addition à du cacao dégraissé de diverses matières végétales à plage de fusion adaptée (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 5.2.6.2.4. Fruits et dérivés :

Des purées de fruits sont utilisées dans la fabrication des mixes pour les crèmes glacées à la fraise par exemple et ainsi que pour la plupart des sorbets. Ces préparations de fruits spécialement élaborées pour les glaciers peuvent se présenter réfrigérées et conditionnées sous atmosphère modifiée, surgelées ou plus rarement déshydratées voire lyophilisées.

Les fruits sont également ajoutés en continu par des distributeurs d'ingrédients en sortie du freezer, de manière à proposer des produits finis avec des morceaux et renforcer ainsi l'attrait des fruits pour le consommateur. Dans ce cas de figure, on peut utiliser des fruits secs mais également des morceaux de fruits obtenus par déshydratation osmotique (fruits confits), par dessiccation suivie d'un trempage dans l'alcool (raisins macérés).

Également, on peut aussi ajouter des fruits sous forme de sauces à basse température de congélation. Ces produits seront ainsi toujours liquides à la température de la crème glacée et permettront soit de créer des marbrures colorées internes, soit de fourrer l'intérieur d'une glace en bâtonnet ou en barre, soit de produire un effet nappant sur le produit lors de sa consommation (**Boutonnier, 2001**).

### 5.2.6.2.5. Alcools :

Qu'il s'agisse de rhum ou de diverses liqueurs à base de macération de plantes, ces produits sont également des préparations conçues pour la personnalisation des crèmes glacées. En effet, l'addition d'alcool dans le mix peut abaisser de manière très importante sa température cryoscopique et poser ainsi des problèmes de stabilité physico-chimique du produit fini. C'est

la raison pour laquelle, on recherche plus la saveur typique de liqueur qu'un degré d'alcool élevé (**Boutonnier, 2001**).

### **5.2.6.3. Œufs et ovo-produits :**

Certaines glaces et crèmes glacées peuvent renfermer des œufs entiers, ou encore des jaunes d'œufs qui présentent certains avantages. Le jaune, outre son pouvoir colorant contient de la lécithine qui est un agent émulsionnant très hydrophile et par conséquent particulièrement intéressant pour la fabrication du mix qui est une émulsion de type huile dans l'eau. Quant au blanc d'œuf, c'est un excellent agent moussant qui permet de faciliter le foisonnement du mix. Ces ovo-produits se présentent soit sous forme liquide réfrigérée, soit sous forme congelée pouvant être sucrée ou encore déshydratée (**Boutonnier, 2001**).

### **5.2.6.4. Inclusions et décors divers :**

Les glaces sont des produits festifs et constituent un excellent terrain pour l'innovation et l'animation notamment en ce qui concerne les produits destinés aux enfants. Qu'il s'agisse de meringues, de mini-gâteaux, de chewing-gums ou encore de granules libérant du gaz carbonique et provoquant un pétilllement dans la bouche. La liste de ces artifices est longue et toutes les pistes n'ont pas encore été explorées ! (**Boutonnier, 2001**).

### **5.2.6.5. Additifs :**

#### **5.2.6.5.1. Émulsifiants :**

Dans la première étape de la fabrication des crèmes glacées, autrement dit élaboration du mix, on doit réaliser une émulsion dans laquelle la phase aqueuse doit disperser la phase grasse. Pour cela, il faut trouver dans le milieu des agents tensioactifs très hydrophiles, c'est le cas des protéines laitières et de la lécithine de jaune d'œuf. Ensuite lors de la transformation du mix en crème glacée dans le freezer, on recherche une déstabilisation partielle de cette émulsion de manière d'une part à faciliter lors du foisonnement la dispersion de l'air dans la phase liquide sous forme de fines bulles et d'autre part à flocculer la phase grasse par agglomération partielle des globules gras, cela afin de stabiliser la dispersion d'air dans le mix (**Boutonnier, 2001**).

#### **5.2.6.5.2. Épaississants, gélifiants et stabilisants :**

Dans le but de diminuer la quantité d'eau libre congelable dans les préparations, on peut recourir à l'emploi de ces agents texturants. La réglementation permet l'usage de nombreux additifs tels que les alginates de sodium, de potassium, et d'ammonium, l'agar-agar, la farine de graines de caroube, la farine de graines de guar, la pectine, la pectine amidée, les carraghénanes, la gomme xanthane et carboxy-méthyl-cellulose.

Afin de renforcer le rôle des épaississants et des gélifiants, entre autres, on peut ajouter du phosphate tricalcique ainsi que certains phosphates et polyphosphates en raison de leur fort pouvoir de liaison et de rétention de l'eau (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 1.2.6.5.3. Acidifiants :

La correction du pH du milieu peut être réalisée par addition d'acides organiques ou de leurs sels. C'est ainsi que les correcteurs d'acidité suivants sont autorisés : l'acide citrique (E330) ainsi que ses sels tels que les citrates de sodium (E331), de potassium (E332), de calcium (E333) (**Dudez et al., 2017**)

### 1.2.6.5.4. Colorants :

On admet l'usage de plusieurs substances afin de renforcer les couleurs des produits du jaune au noir, en passant par l'orange, le rouge, le vert, le bleu et le marron (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 5.2.6.5.5. Arômes :

Les quantités minimales d'arômes à employer pour la fabrication des produits laitiers glacés varient selon les produits. En outre, on peut employer ces arômes seuls ou en complément pour renforcer la saveur des fruits (**Lapointe-Vignola, 2002**).

### 5.2.6.5.6. Divers :

Il est à noter que le lactose hydrolysé est également utilisé, en raison de sa faible solubilité et des risques de cristallisation. On peut en apporter par l'incorporation de poudres lactières hydrolysées par voie acide ou enzymatique. Ce lactose est alors transformé en glucose et en galactose, deux glucides plus solubles dans l'eau que le lactose originel (**Lapointe-Vignola, 2002**).

## 1.2.2. Le procédé de fabrication de la crème glacée :

La crème glacée se présente sous forme d'une mousse glacée, autrement dit d'une dispersion d'air dans un mélange liquide, stabilisée par un fort abaissement de température (**Dudez et al., 2017**). Le procédé se déroule en deux étapes. La première consiste à préparer le mélange des ingrédients, on parle de « mix », la deuxième consiste à glacer le mélange, le conditionner, puis le surgeler (**Dudez et al., 2017**). L'étape la plus délicate consiste à établir une recette (ou formulation) équilibrée techniquement. La proportion des ingrédients doit respecter certaines règles pour obtenir un résultat satisfaisant : bonne texture, résistance à la fonte, goût agréable de crème glacée (**Dudez et al., 2017**). Une ligne de fabrication est présentée sur l'annexe 1 (**Boutonnier, 2001**).

**Tableau1. Fabrication de la crème glacée (Branger, 2007).**

<b>Opération unitaires</b>	<b>Type d'opération</b>	<b>Rôles</b>
Mélange des ingrédients	Mélange solide/liquide	Faciliter la dissolution des poudres. Baisser la viscosité.
Homogénéisation	Réduction de taille	Réduire la taille des globules gras pour empêcher la coalescence des nouveaux globules formés. Disperser les éléments de la suspension. Désagréger les agrégats. Stabiliser l'émulsion.
Pasteurisation	Stabilisation par la chaleur	Détruire tous les microorganismes pathogènes et une grande partie de la flore d'altération. Dénaturer certaines protéines. Solubiliser les agents de texture.
Maturation	Stabilisation par le froid	Cristalliser partiellement la matière grasse. Parfaire l'hydratation des protéines du lait et des stabilisants.
Foisonnement	Mélange liquide/gaz	Disperser du gaz pour rendre la texture aérée.
Glaçage	Stabilisation par le froid négatif et mélange	Cristalliser une partie de l'eau du mélange. Répartir les bulles d'air. Libérer la matière grasse liquide qui va former un film autour des bulles d'air pour les stabiliser. Texture le produit.
Formage	Conditionnement	Doser la crème glacée dans les contenants.
Surgélation	Stabilisation par le froid négatif	Poursuivre la cristallisation de l'eau libre congelable pour stabiliser la mousse. Stabiliser le produit du point de vue microbiologique. Stabiliser la texture du produit dans le temps.

**1.2.2.1. Etape1 : mélange et agitation des ingrédients :**

Le lait employé pour la préparation des crèmes glacées doit obligatoirement être pasteurisé. Le mélange des ingrédients se fait selon un ordre préétabli. On commence toujours par mélanger les ingrédients liquides entre eux (lait, sirop de glucose). L'agitation doit être permanente et chauffée jusqu'à +50 °C. Les produits secs sont préalablement mélangés entre eux (lait en poudre, sucre et autres ingrédients en poudre) afin de faciliter leur dissolution dans les ingrédients liquides. L'agitation doit être énergique et on utilise pour cela un mixeur. On termine par l'addition de la matière grasse (crème fraîche ou beurre en transformation fermière à une température au moins égale à +60 °C. la matière grasse est incorporée sous agitation intense afin de la disperser correctement. On parle de « mix » pour désigner la préparation obtenue (Dudez et al., 2017).

### 1.2.2.2. Étape 2 : Pasteurisation du mix :

La pasteurisation consiste à détruire les microorganismes contenus dans le mix. Elle est obligatoire afin de garantir la sécurité des aliments au consommateur. Si le mix pasteurisé n'est pas utilisé dans l'heure qui suit, il doit être conservé à +4°C. La congélation doit obligatoirement intervenir dans les 24 heures. La pasteurisation permet également de faciliter la dispersion et la dissolution des ingrédients secs. Elle s'effectue dans de petites cuves de pasteurisation à +85°C pendant 15 secondes (Dudez et al., 2017).

### 1.2.2.3. Étape 3 : Refroidissement puis maturation physique :

La maturation consiste à maintenir le mix à basse température (+4 °C) en agitant doucement pendant 4 à 20 heures. Cette étape effectuée généralement la nuit. Elle permet d'améliorer la texture et la résistance à la fonte de la crème glacée et facilite le foisonnement et le glaçage. Le refroidissement doit être aussi rapide que possible pour éviter les modifications de goût ainsi que la prolifération des microorganismes. On ajoute, lors de cette étape, les ingrédients qui n'ont pas besoin de subir de pasteurisation : arômes et colorants naturels, purées ou morceaux de fruits, pépites, graines, yaourt... etc. (Dudez et al., 2017).

### 1.2.2.4. Étape 4 : Foisonnement et glaçage :

Ces deux opérations se réalisent conjointement dans un même appareil. On peut utiliser une turbine, il faut alors compter de 20 à 30 minutes, ou un freezer, qui nécessite seulement une minute (Dudez et al., 2017). Le foisonnement consiste à aérer le mix afin de lui donner ; juste avant la congélation, une structure de type mousse. On obtient :

- Soit par l'incorporation d'air *au-dessus* du mélange et l'activité modérée d'un racleur rotatif, c'est ce que permet une turbine discontinue ou sorbetière ;
- Soit par l'injection d'air en continu grâce à une pompe et l'activité intense d'un batteur rotatif, c'est ce que permet un freezer continu (Dudez et al., 2017).

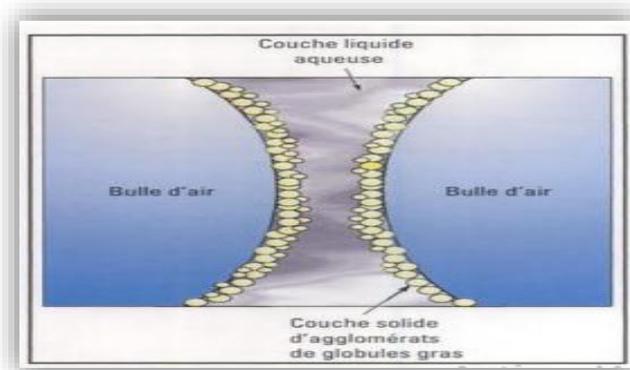


Figure 3. Phénomènes observés à l'interface gaz/liquide (Lapointe-Vignola, 2002).

Le glaçage a pour objectif de répartir les cristaux de glace et de stabiliser la mousse. On passe d'une température de +4 à -6 °C. La réussite de l'opération dépend de la rapidité de refroidissement, tout particulièrement entre -2 à -5 °C, zone critique pour la cristallisation. Les inclusions en morceaux (brisures, fruits entiers) sont ajoutées directement dans la turbine, ou en sortie de freezer dans la crème glacée. Il est important de les incorporer froids (+4 °C) pour ne pas révéler la température du mix (Gret, 2002).



**Figure 4.** Machine pour la fabrication de crèmes glacées (Gret, 2002).

### 5.2.2.5. Étape 5 : Moulage et conditionnement :

La crème glacée est conditionnée dans les emballages plastiques quand elle est encore malléable (-4 à -5 °C). Cette opération est manuelle dans le cas des productions fermières. Il faut prendre soin de bien respecter la quantité exprimée en litre en mentionnée sur l'étiquette (Gret, 2002).

### 5.2.2.6. Étape 6 : Surgélation/durcissement :

Lorsque la crème glacée est sortie de la turbine et conditionnée, son pourcentage d'eau converti en glace n'est que 50%. Dans cet état, le produit fini est mou. On consiste que la crème glacée est suffisamment durcie lorsque le pourcentage d'eau congelée atteint 90%. La surgélation descend la température à -20/-30 °C. Le temps d'attente entre la sortie de la turbine et le début de la congélation doit être le plus court possible. L'utilisation d'une cellule de surgélation est fortement conseillée.

Un simple congélateur n'assure pas un refroidissement suffisamment rapide. En l'absence de surgélateur, on peut utiliser deux congélateurs. L'un réglé à -30 °C pour assurer une congélation aussi rapide que possible est le deuxième à -20 °C pour la conservation (Gret, 2002).

### 5.2.2.7. Étape 7 : Stockage à l'état congelé :

Les crèmes glacées doivent être stockées à -20 °C jusqu'à la vente au consommateur. Une attention particulière doit être portée aux conditions de transport (véhicule frigorifique onéreux) et l'utilisation de caisse isotherme assure une conservation de très courte durée (**Gret, 2002**).

### 5.3 Valeur nutritionnelle de la crème glacée :

Une portion de 125ml de glace (soit environ 2 boules) apporte en moyenne 150 calories, 7 g de matières grasses, 20 g de glucides et 100 mg de calcium. L'apport calorique peut toutefois monter en flèche selon le type de glace, si on ne s'en tient pas à une portion raisonnable, ou si on l'agrémente de sauce au chocolat, de bonbons ou crème chantilly [4].

La « crème glacée aux œufs » (celle des glaciers artisanaux) est la plus riche : elle renferme au moins l'équivalent d'un jaune d'œuf et de 8 à 10 g de crème fraîche pour 100 g de produit. La « crème glacée » doit contenir au moins 7 % de matières grasses laitières. Une portion de 100 g de crème glacée peut compter 207 calories [4].

Pour les « glaces » (sans autre précision), on n'impose pas un minimum de graisses laitières. Ce sont ces corps gras qui confèrent à la glace son onctuosité, mais on ajoute presque toujours épaississants, liants ou autres gélifiants (pectine, gélatine, carraghénane, gomme de guar, cellulose...) pour lui donner plus de tenue. On peut aussi l'additionner d'acidifiants, d'arômes et de colorants autorisés. Il suffit, ensuite de foisonner le produit, autrement dit de lui incorporer de l'air avant sa prise au froid [4].

### 5.4 Défauts de la crème à la glace :

La crème à la glace fabriquée n'est pas toute d'une qualité idéale : Elle ne diffère pas des autres produits alimentaires. Cet idéal varie plus que pour les autres produits laitiers à cause des goûts individuels et des nombreuses essences employées dans la fabrication. Mais certains défauts, assez bien définis, se rencontrent dans la crème à la glace à cause de l'emploi d'essence inférieure, de produits de mauvaise qualité ou de méthodes négligentes de fabrication (**White, 1947**). Les défauts qui se rencontrent communément dans la crème à la glace peuvent être groupés de la façon suivante :

- (1) Défauts du goût.
- (2) Défauts du corps et de la texture.
- (3) Défauts de la richesse.
- (4) Défauts de couleur, d'apparence et d'emballage.

Les moins graves sont ceux qui sont dus à l'emploi d'un excès de sucre ou d'une trop petite quantité de sucre et d'un excès ou de trop peu d'essence aromatique. Ces défauts résultent des goûts individuels et le fabricant qui étudie les goûts de ses clients peut facilement les corriger (**White, 1947**).

Les défauts de goût les plus sérieux sont causés par l'emploi de produits laitiers de mauvaise qualité. Les mauvais goûts des produits laitiers peuvent être causés par la nourriture ou l'absorption d'odeurs et de goûts étrangers, les changements bactériens et chimiques, et la contamination par les substances étrangères. Certains goûts comme les goûts amer, de sel, rance, malpropre, aigre, de fruit, métallique, peuvent être causés par l'un ou plusieurs des facteurs qui précèdent. D'autres mauvais goûts peuvent être dus à l'emploi d'un excès de produits de poudre de lait ou de lait condensé et de poudre d'œuf, spécialement si ces produits ne sont pas de la meilleure qualité. On prévient presque tous les défauts de goût en examinant scrupuleusement tous les matériaux pour rejeter tous ceux qui sont de mauvaise qualité et en se servant d'un outillage propre et en bon état (**White, 1947**).

Les termes généralement employés pour décrire les défauts de corps et de texture sont les suivants : faible ou floconneuse, humide, glacée, grossière, butyreuse et granuleuse. Ces défauts sont dus à un mauvais équilibre du mélange et à de mauvais procédés de fabrication. Le corps et la texture faibles ou floconneux sont causés par un pourcentage trop faible de solides non gras du lait, trop peu de gélatine ou d'autre stabilisateur ou trop de gonflement. Une crème à la glace de ce genre fond trop rapidement et elle diminue excessivement lorsqu'elle sort du bidon. Une texture et un corps grossiers se révèlent à la langue ; ils peuvent être causés par un manque de solides non gras ou de gélatine ou par le fait que l'on a tiré la crème à la glace du congélateur lorsqu'elle était encore trop molle. Ces conditions provoquent la formation de grosses cellules d'air au cours du fouettage qui se rompent et forment des cristaux de glace. Un corps et une texture glacés résultent des mêmes conditions que la texture grossière, ils sont caractérisés par la présence de gros cristaux de glace qui se révèlent au goût (**White, 1947**).

La crème à la glace humide est lourde et parfois collante ; elle provient de l'emploi de trop de solides non gras ou de solides totaux et parce que la congélation n'a pas été assez forte pour produire un gonflement suffisant. Il ne faut pas confondre la crème à la glace granuleuse avec le défaut causé par la formation d'un excès de cristaux de glace. Cette crème granuleuse à une sorte de texture graveleuse, facilement reconnaissable au goût, et elle est causée par la cristallisation du lactose ou du sucre de lait dans la crème à la glace. Ce désordre se développe généralement après le durcissement, car le sucre de lait est plus soluble dans les solutions chaudes que dans les solutions froides. Cet état sablonneux peut se développer dans de la crème

à la glace qui contient une trop forte proportion de solides totaux ou de solides non gras du lait, ce qui donne une quantité excessive de sucre de lait au mélange. L'amollissement et le durcissement alternatifs produisent souvent l'état granuleux de la crème à la glace lorsque la proportion de solides totaux est élevée. Le remède est de proportionner le mélange soigneusement, de façon que la concentration du sucre de lait ne soit pas trop élevée. D'autres défauts sont dus à la coloration artificielle de la crème à la glace ou à un mauvais emballage qui enlèvent à l'apparence du produit fin (**White, 1947**).

# Chapitre II

## Microbiologie des crèmes glacées

### I. Indicateurs de la non-conformité microbiologiques des crèmes glacées :

Les paramètres à contrôler sont généralement les micro-organismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique (germes témoins de contamination fécale, germes pathogènes de contamination des produits manipulés) et les micro-organismes responsables d'une altération de la qualité marchande ou d'une perte de rendement qui doivent être recherchés du début de la fabrication (matières premières) jusqu'au produit fini (**Ndayo-Wouafo, 1994**).

D'après Ndayo-Wouafo (1994) les aliments peuvent être les agents de transmission de divers micro-organismes infectieux ou de leurs métabolites susceptibles de provoquer des intoxications chez l'homme. Ces auteurs regroupent ces micro-organismes en fonction de leur origine la plus fréquente.

#### 1. Les germes totaux ou la flore mésophile aérobique totale :

Le terme « germes totaux (GT) » ou « flore totale » ou encore « Flore Mésophile Aérobie Revivifiable » (FMAR) désigne l'ensemble des bactéries mésophiles aérobies qui se développent à 30 °C pendant 72 heures en laboratoire sur un milieu nutritif gélosé standard. Il comporte un grand nombre de bactéries : lactiques, psychrotrophes, thermorésistantes, coliformes et même pathogènes (**Rapport de l'Institut de l'élevage, 2009**).

Parmi les numérations réalisables, celle de la flore mésophile permet d'évaluer la qualité microbiologique au sens large du terme et reflète l'histoire du produit. Il est ainsi possible, pour un aliment donné, de prédire les types microbiens que l'on a le plus de chance de rencontrer tout au long de leur histoire. Ce nombre de germes totaux représente l'état de fraîcheur ou soumis à divers traitements technologiques, le dénombrement des germes totaux permet de juger de la qualité des opérations de productions, transport, entreposage...etc. cependant, un nombre peu élevé de germes peut ne pas correspondre à un produit sain et vice versa (**Dupin, 1992**).

#### 2. Les Enterobacteriaceae :

Selon Deberghes(1995), les Enterobacteriaceae sont définies par un ensemble de caractères : Bacilles à Gram négatif, mobiles grâce à une ciliature péritriche ou immobiles, non sporulés, présentant une réaction d'oxydase négative, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz et réduisant les nitrates en nitrites. En 1988, la famille des Enterobacteriaceae compte 30 genres et 99 espèces dont une vingtaine doit être connues et correctement identifiées par les bactériologistes médicaux en raison de leur importance (**Deberghes, 1995**).

Les Enterobacteriaceae sont considérées comme un indicateur de contamination fécale, mais aussi de contamination par le milieu extérieur. Toutefois l'emploi des Enterobacteriaceae

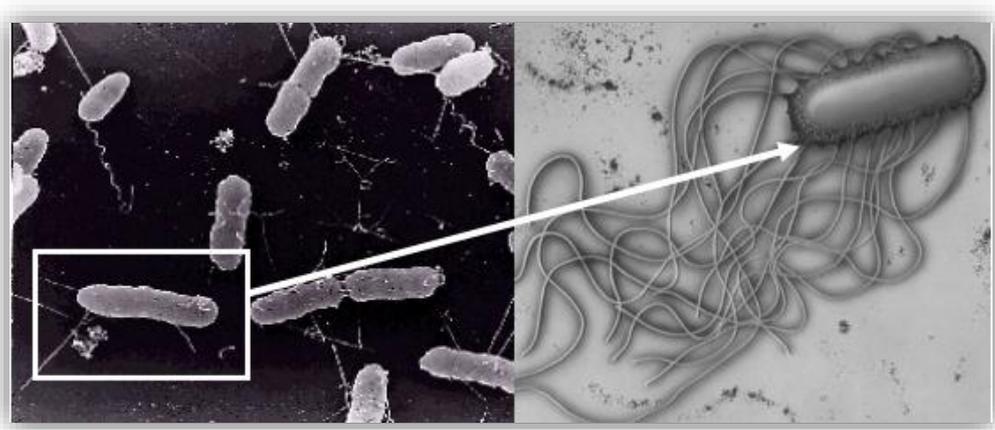
comme indicateur est utile, mais il faut distinguer les Enterobacteriaceae à 37 °C (cas général) de celles qui sont dénombrées à 30 °C.

La présence en grand nombre des Enterobacteriaceae révéle donc un risque de présence de micro-organismes pathogènes dans la denrée alimentaire (**Dromigny, 2011**).

### 3. Les germes pathogènes :

#### 3.1. *Salmonella* sp :

Les salmonelles sont des Entérobactéries bacilles à Gram négatif, mobiles, anaérobies facultatives à forte contagiosité (**Institut de l'élevage, 2009**). Non sporulant, proche de *Escherichia coli*. Ces bâtonnets de 2 à 3 µm de long sont des bactéries mésophiles, peu exigeantes d'un point de vue nutritionnel. La principale voie de contamination pour l'homme est alimentaire. Estime en effet que l'alimentation est, aux Etats-Unis, la cause de 95% des infections à salmonelles. L'infection résulte alors de la consommation d'aliments contaminés. Pour ceux-ci, la contamination peut être intrinsèque, comme cela peut être le cas pour les œufs, ou extrinsèque, suite au contact avec des matières fécales lors de l'abattage pour les aliments issus d'animaux contaminés, ou encore avec une surface ou un autre aliment contaminé lors de la préparation ou de la transformation des denrées ; on parle alors de contamination croisée (**David, 2009**).



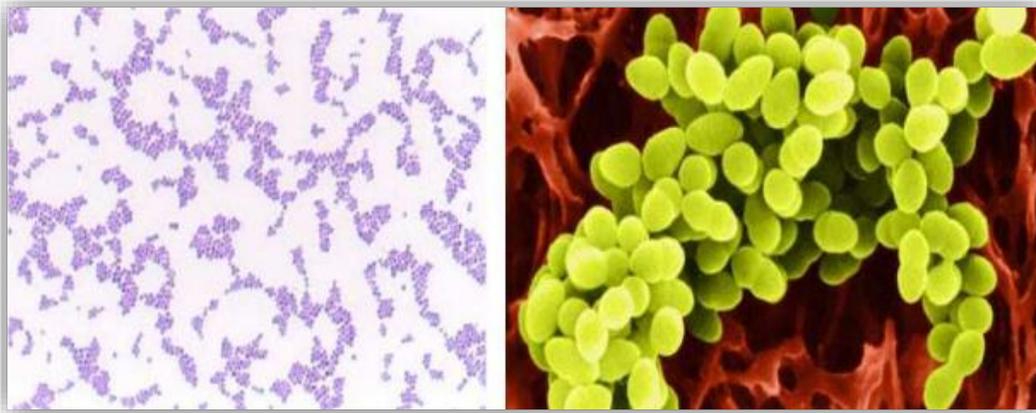
**Photo 1.** Aspect morphologique du *Salmonella typhimurium* en microscope électronique (**Tellier, 2005**).

#### 3.2. *Staphylococcus aureus* :

Le staphylocoque doré est une bactérie de la famille des Micrococcaceae, qui inclut deux genres : *micrococcus* et *staphylococcus*. Le genre *Staphylococcus* regroupe trente-six espèces, dont dix-huit espèces ont été retrouvées chez l'homme parmi lesquelles *S. aureus* qui peut être responsable de nombreuses infections. *S. aureus* est une cocci à Gram positif (de 0,5

à 1 µm de diamètre) groupé le plus souvent en amas. La coloration Gram-positif ainsi que la microscopie électronique révèlent une croissance de *S. aureus* en amas. *S. aureus* se distingue des autres staphylocoques par la pigmentation doré de ses colonies et sa capacité à fermenter le mannitol et à synthétiser une coagulase et une désoxyribonucléase. Il est non exigeant, pousse sur des milieux de culture usuelles (Ouiam, 2014).

*S. aureus* est l'hôte naturel des muqueuses et de la peau chez l'homme et les animaux. Sa température de croissance se situe entre 7 et 48 °C avec un optimum à 37 °C. Il survit au froid et à la congélation. Il survit à des taux de salinité élevés (20%). *S. aureus* seul n'est pas dangereux pour l'homme mais l'entérotoxine qu'il produit dans certaines situations est responsable de toxi-infection alimentaire. La production de toxine dépend de la souche incriminée, du niveau de contamination du produit et du milieu. Les toxines produites résistent à la pasteurisation, à la déshydratation, à la congélation et à différents enzymes protéolytique (Rapport de l'Institut de l'élevage, 2009).



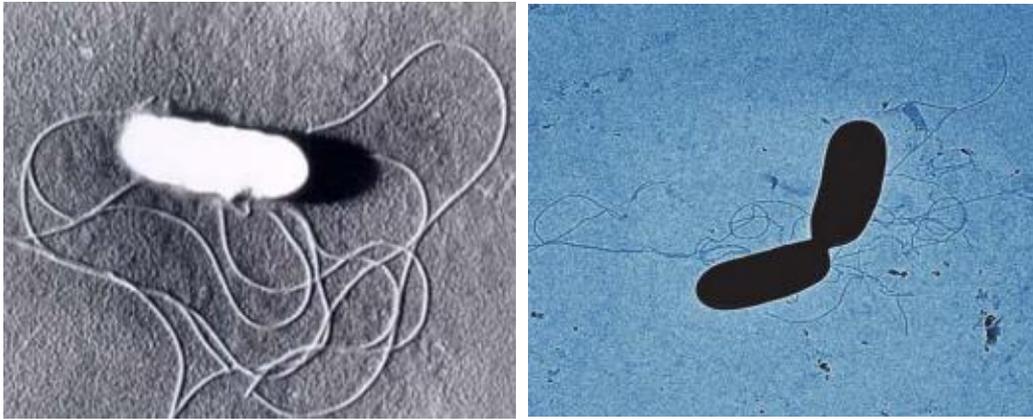
**Photo 2.** Aspect morphologique du *S. aureus* en microscopie optique (A) (X1000) et en microscopie électronique (B) (X15000) (Ouiam, 2014).

### 3.3. *Listeria monocytogenes* :

*L. monocytogenes* est un bacille à Gram positif se présentant sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5-2,0 µm de longueur sur 0,4-0,5 µm de diamètre, aux extrémités arrondies, associés parallèlement, ou en courtes chaînes, ou en paires sous forme de V. Dans les cultures âgées et en milieux carencés, des filaments de 6 à 20 µm peuvent se former. La bactérie n'est ni capsulée ni sporulée. Elle est mobile par des flagelles péritriches quand elle est cultivée à 20-25°C, et immobile ou faiblement mobile à 37°C (Rapport de la commission Listeria de l'AFSSA, 2000).

La contamination d'un aliment par la *L. monocytogenes* est l'un de nombreux dangers biologiques qui devraient être considérés lors d'une évaluation des dangers et lors de

l'élaboration d'un plan de contrôle préventif. Les aliments prêts-à-manger (PAM) contaminés par *L. Monocytogenes* à un niveau dépassant 100 unités formatrices de colonies par gramme (UFC/g) d'aliment ont été associés à des éclosions de listériose (**Agence canadienne d'inspection des aliments, 2019**).



**Photo 3.** *L. monocytogenes* sur microscopie électronique (**Herro, 2006**).

### **II. Effet de la congélation sur les microorganismes dans la crème glacée :**

Les desserts ne sont pas seulement synonymes de plaisir. Ils peuvent être particulièrement dangereux pour la santé. Les glaces en sont le parfait exemple : outre leurs effets sur votre ligne et votre glycémie, elles peuvent également se révéler redoutables en matière d'intoxication alimentaire (**Bashir, 2018**).

En 2015, cinq personnes ont été hospitalisées et trois autres sont mortes après avoir mangé de la glace qui avait été contaminée par la *Listeria* au Kansas ; dans certains cas la faute peut être mise sur les entreprises et leurs processus de fabrication, dans d'autres les consommateurs sont les seuls coupables, et ce pour une raison toute simple (**Garnier, 2018**).

Une glace fond naturellement très vite à température ambiante. «Ce mélange de sucre et de lait est parfait pour la prolifération de bactéries», (**Bashir, 2018**). En effet, l'augmentation de la température est responsable de la multiplication des bactéries : une glace laissée dehors puis remise au congélateur est alors susceptible d'avoir été contaminée et ainsi d'entraîner un risque d'intoxication alimentaire chez la personne qui la ressort ensuite pour la consommer, surtout en période de canicule où le mercure est très élevé. Il est primordial de ne pas laisser la glace dehors et de la remettre au congélateur directement après s'en être servi. Les glaces vendues dans le commerce doivent être faites à base d'œufs pasteurisés. La pasteurisation permet de conserver les aliments en les chauffant à moins de 100°C et ainsi préserver ses propriétés gustatives et bactériologiques (**Garnier, 2018**).

### III. Risque sanitaire lié à la consommation de la crème glacée :

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) apporte son concours aux états membres afin qu'ils renforcent leur capacité à prévenir, détecter et gérer les risques d'origine alimentaire. Ses activités sont notamment la production de données de référence et de données relatives aux tendances dans le domaine des maladies d'origine alimentaire et le soutien apporté à la mise en place d'infrastructures appropriées (OMS, 2019).

Le secteur des crèmes glacées industrielles et artisanales est étroitement contrôlé et les mesures d'hygiène sont drastiques. Cependant, le risque sanitaire est associé à la glace dite à l'ancienne, fabriquée «comme à la maison» par l'homme «au blouson blanc». Le plus souvent vendu devant les écoles, dans des kiosques spécialisés ou dans des crèmeries (El Ouali Alami et al., 2013). Le marché de la glace en Algérie représente une moyenne approximative de 25 millions de litres de crème glacée produite par an (Bouaricha, 2007).

#### 1. Les intoxications alimentaires :

L'intoxication alimentaire est un trouble très fréquent le plus souvent bénin mais qui peut causer des complications mortelles [5]. Les intoxications alimentaires sont dues à la consommation d'aliments contaminés par des bactéries, des virus ou des parasites. Certains aliments sont plus particulièrement à risque (Badri et Necib, 2016).

#### 2. Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) :

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont des maladies à déclaration obligatoire. Les TIAC sont définies comme l'apparition d'au moins 2 cas d'une symptomatologie digestive dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. Les principaux agents infectieux sont les salmonelles (84% des cas), les staphylocoques dorés (8% des cas) et les *Clostridium perfringens* (4% des cas). Les foyers à salmonelles sont surtout déclarés en restauration familiale alors que ceux à *C. perfringens* et staphylocoques surviennent uniquement en restauration collective. Les aliments responsables sont surtout les œufs (40%) consommés crus, les produits mixtes (22%), les viandes et volailles (14%), les poissons et crudités (11%), les aliments d'origine non animale (10%), le lait et les produits laitiers (4%) (Pebret, 2003).

Les principaux facteurs qui favorisent les TIAC sont la contamination de l'équipement de cuisine (40%), les erreurs dans le processus de préparation (46%), le non-respect de la chaîne du froid (39%), la contamination des matières premières (34%) et un délai trop important entre la préparation et la consommation (33%), les facteurs pouvant se combiner.

La pathologie est liée soit à la multiplication des bactéries au niveau de la muqueuse intestinale, soit à l'action d'une toxine libérée par les bactéries qui ont alors un rôle négligeable. On distingue principalement :

- Les toxi-infections alimentaires à salmonelles (les salmonelles autres que la fièvre typhoïde)
- La toxi-infection alimentaire à staphylocoque doré
- Le botulisme
- La fièvre typhoïde (salmonelles à *Salmonella typhi*) (Pebret, 2003).

### 3. Prévention des toxi-infections alimentaires :

#### 3.1. Prévention primaire :

- Hygiène :
  - De la production des matières premières (stockage, emballage, préparation, propreté du matériel et des mains). Y compris lors du transport : chaîne du froid. De préférence pour les produits industriels,
  - Surveillance et contrôles :
    - Dépistage de porteurs asymptomatiques de germes parmi les employés
    - Éviction des salariés infectés ;
- Destruction des germes, spores et toxines :
  - Moyen : chaleur,
  - Limitations : spores, toxines du staphylocoque (thermorésistantes) ;
- Remise en état des usines de fabrication ;
- Formation des acteurs de la chaîne :
  - Tenue, hygiène corporelle et générale,
  - Surveillance médicale ;
- Prélèvements bactériologiques de routine :
  - Sur les aliments mis en vente, par les services vétérinaires,
  - Sur les sources et circuits de distribution de l'eau, par les services d'hygiène.

#### 3.2. Prévention secondaire :

- Correction des défaillances repérées ;
- Consignation des aliments suspects ;
- Éviction des porteurs de germes ;
- Suspension des activités d'une usine en cause ;

- Information du public (Somogyi, 2017).

#### IV. Qualité des crèmes glacées :

Les crèmes glacées sont des denrées très périssables et très sensibles à la contamination.

##### 1. Hygiène de la fabrication :

La gestion de la qualité a montré qu'un contrôle statistique de la microbiologie du produit fini ne fournit pas les indications utiles sur les causes éventuelles de l'altération observée. Ainsi est-il conseillé aux industriels et aux artisans glaciers, la mise en place d'autres points techniques de gestion et de contrôle de la qualité aptes à mieux suivre les étapes de la production, et acquérir un degré important de sécurité relative à la qualité du produit (Ndao, 1994).

##### 2. Règles générales :

Le respect des règles d'hygiène est la base fondamentale pour espérer aller au-delà dans la garantie de produit de qualité. Elles s'appliquent aux locaux, aux équipements et au personnel (Ndao, 1994).

#### V. La sensibilité aux antibiotiques :

Le besoin de normalisation en matière de tests de sensibilité aux antibiotiques a été ressenti dès le début des années 1950. C'est ainsi qu'ont été réunis plusieurs comités d'experts dans le cadre de l'organisation mondiale de la santé afin de parvenir à une standardisation internationale dans ce domaine. S'il a été facile d'atteindre un relatif consensus en ce qui concerne la description des différentes méthodes utilisées pour étudier la détermination de la sensibilité aux antibiotiques (détermination de la concentrations minima inhibitrice (CMI) par dilution en milieu liquide et en milieu gélosé, antibiogramme par diffusion en gélose), il n'en a pas été de même en ce qui concerne la détermination des concentrations critiques utilisées pour catégoriser les souches bactériennes dans un but d'orientation thérapeutique; en effet, deux conceptions se sont d'emblée opposées : celle qui donnait la priorité à la distribution des CMI des populations bactériennes et celle qui donnait un poids beaucoup plus important aux paramètres pharmacocinétiques ainsi qu'aux résultats cliniques. La première conception a abouti à des «catégories cliniques» fondées sur des critères pharmacocinétiques et cliniques (Bergmann et al., 2001).

# Chapitre III

## Matériel et méthodes

### **I. Cadre d'étude :**

Dans cette modeste contribution, nous proposons d'étudier la qualité bactériologique de la crème glacée vendue dans la ville de Guelma. L'essentiel de cette étude consiste en la définition du lieu et de la période d'étude et dans un second lieu suivre la méthode d'analyse répondant aux exigences du Journal Officiel de la République Algérienne N°39 14 du 02.07.2017 et ce du prélèvement, aux analyses bactériologiques demandées en passant par la conservation des produits à analyser et des souches isolées.

#### **1) Objectif :**

L'objectif visé dans notre étude consiste en la détection, l'isolement et l'identification des souches bactériennes dans les crèmes glacées des crémeries de la ville de Guelma avec une contribution à l'étude de leur sensibilité et à leur résistance aux antibiotiques.

#### **2) Type et période d'étude :**

La présente étude en tant qu'approche expérimentale consiste à étudier la qualité bactériologique des crèmes glacées prêtes à être consommées dans la ville de Guelma et vise à déterminer la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées pendant les mois de juillet et d'aout 2018.

#### **3) Lieu de prélèvements :**

Les prélèvements ont été réalisés à partir d'échantillons recueillis de différentes crémeries de la ville de Guelma. Le nombre total d'échantillons prélevés est de onze.

#### **4) Lieu d'étude :**

Les prélèvements réalisés ont été analysés au laboratoire d'hygiène de la Direction de la santé et de la Population (DSP) de la wilaya de Guelma que nous remercions.

#### **5) Prélèvement :**

Les crèmes glacées ont été prélevées directement de onze crémeries dans des pots en plastiques couverts avec des couvercles en carton.

#### **6) Acheminement, transport et réception des échantillons au laboratoire :**

Les échantillons prélevés ont été acheminés immédiatement au laboratoire d'hygiène de la DSP de la wilaya dans une glacière contenant des carboglaces maintenue à une température de -15°C, pour réaliser des analyses microbiologiques. Un contrôle systématique de la qualité des échantillons a été fait au laboratoire avant d'être analysés, il englobait :

- La mesure de la T° de la glacière,

- L'identification des échantillons,
- L'heure de prélèvement,
- Le délai de transport,
- La conformité du prélèvement...etc.

## II. Étude bactériologique :

Cette étude demande l'utilisation d'un matériel stérile et adéquat et d'une méthode fiable.

### 1. Méthode :

L'analyse des crèmes glacées a été réalisée selon les exigences du Journal Officiel de la République Algérienne JORA N°39 14 du 02.07.2017. Les microorganismes dénombrés ou recherchés sont essentiellement :

- Germes totaux
- Les Staphylocoques à coagulase +
- Les Enterobacteriaceae
- Les *Salmonella*
- et *Listeria monocytogenes*

### 1.1. Préparation des échantillons :

Les échantillons à analyser sont préparés en solutions mères suivis des dilutions décimales et des ensemencements sur géloses adéquates.

### 1.2. Solution mère (SM) :

Après décongélation de la crème glacée, devant le bec Bunsen, 25g de cette crème sont introduit dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE (NaCl + tryptone).



**Photo 4.** Préparation de la solution mère  $10^{-1}$  (Photo personnelle)

L'homogénéisation est assurée par des mouvements de rotation du flacon. La solution mère (S.M) ainsi obtenue est de dilution  $10^{-1}$ . Elle servira à ensemercer des milieux de culture et à préparer d'autres dilutions après 30 minutes de revivification des germes (Ndao, 1994).



**Photo 5.** Les solutions mères (Photo personnelle)

### 1.2.1. Dilution décimales :

Le contrôle de la qualité microbiologique des crèmes glacées obéit au respect des principes des protocoles de l'ensemencement et surtout aux des préparations des dilutions décimales.

#### ✓ Principe :

La préparation des dilutions décimales a lieu en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume. Il peut nous permet après incubation, soit d'observer les éventuels développements si nous optons pour le cas des tubes ou d'effectuer les dénombrements des colonies si nous utilisons les boites de Pétri.

#### ✓ Protocole :

Le protocole s'accomplit à partir de plusieurs actions qui sont notamment :

- Le transvasement qui s'exécute à l'aide d'une pipette Pasteur stérile 1ml de la solution mère (SM) dans un tube de 9 ml d'Eau Physiologique Stérile (EPS).
- Le mélange avec un vortex.

Cette opération est répétée sur les dilutions décimales allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$ , en changeant à chaque dilution de pipette stérile.

### 1.2.2. Ensemencement :

Les échantillons sont ensemencés en profondeur ou en surface selon les flores recherchées et ceci en respectant les normes préconisées pour chaque germe recherché. Le tableau N°2 résume les méthodes d'analyses utilisées.

- **Gélose nutritive.**

Ce milieu est dit non sélectif car il ne permet pas de sélectionner une souche bactérienne précise. Ce milieu permet donc à toutes souches bactériennes de pouvoir pousser, à condition qu'elles soient non exigeantes, autrement dit les souches peuvent pousser sur un milieu minimum qui n'apporte que les éléments essentiels à leur développement (Ndao, 1994).

- **Gélose Hektoen :**

La gélose Hektoen est un milieu d'isolement des Salmonelles et des Shigelles bien que de nombreuses bactéries à Gram négatif puissent se développer sur cette gélose. L'identification des Entérobactéries pathogènes repose sur la non utilisation des glucides présents dans le milieu (Silue, 2005).

- **Gélose Chapman :**

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif. Il est surtout utilisé en microbiologie médicale permet la croissance des germes halophiles. Parmi ces derniers figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus* et de rares bactéries à Gram négatif (Silue, 2005).

- **Gélose SS (Salmonella-Shigella) :**

C'est un milieu sélectif permettant l'isolement des Entérobactéries pathogènes. Il est très utilisé pour la recherche des *Salmonella* dans les selles et dans les denrées alimentaires et des *Shigella* (Silue, 2005).

- **Gélose au sang :**

C'est un milieu d'isolement enrichi de sang sur lequel les streptocoques se développent. Il permet de déterminer le caractère hémolytique de ces bactéries (Silue, 2005).

**Tableau 02.** Résumé des méthodes d'analyse bactériologique utilisées.

<b>Paramètres Microbiologiques</b>	<b>Volume d'inoculum</b>	<b>Milieu d'ensemencement</b>	<b>Méthode d'ensemencement</b>	<b>Condition d'incubation</b>
Germes totaux	0.1ml	Gélose nutritif	Par incorporation	<b>18 à 24 h à 37°C</b>
<i>Staphylococcus</i>	5 gouttes	Chapman	Par râteau (étalement)	<b>18 à 24 h à 37°C</b>
Enterobacteriaceae	5 gouttes	Hektoen	Par râteau (étalement)	<b>18 à 24 h à 37°C</b>
<i>Salmonella</i>	0.1ml	Gélose SS	Par des stries trop séré	<b>18 à 24 h à 37°C</b>
<i>Listeria monocytogenes</i>	5 gouttes	Gélose au sang	Par râteau (étalement)	<b>18 à 24 h à 37°C</b>

**1.2.2. Dénombrement et identification des germes :**

Ces deux opérations commencent par l'étude de l'aspect macroscopique des colonies, soit la taille et la forme, l'aspect de la surface, la consistance et la couleur et/ou pigment des germes.

**1.2.3.1. Aspect macroscopique :**

L'identification des germes débute par l'observation de l'aspect morphométrique des colonies obtenues sur les différents milieux d'isolement. Cette observation servira de moyen d'orientation pour une identification plus approfondie (**Bousseboua, 2003**).

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué à partir de l'isolement après incubation. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé de la durée et de la température de l'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir de colonies bien isolées (les colonies sont d'autant plus petites quand elles sont rapprochées). La colonie apparaît à la surface du milieu de culture pour les germes aérobies ou en profondeur pour les germes anaérobies (**Avril, 2007**).

**1.2.3.1.1. La taille :**

Elle peut être mesurée à l'aide d'une règle graduée pour les grandes colonies. Il est possible aussi d'utiliser le microscope au grossissement le plus faible, en utilisant de micromètres oculaires, pour mesurer la taille des petites colonies.

### 1.2.3.1.2. La forme :

- Allure de contours : lisse, dentelés, déchiquetés, irréguliers.
- Relief : surface bombée, demi-bombée, plate.
- Centre : parfois surélevé, parfois ombiliqué (en creux).

### 1.2.3.1.3. L'aspect de la surface :

La surface d'une colonie bactérienne peut être lisse, rugueuse, renvoyer la lumière de façon à leur donner un reflet métallique ou un aspect irisé.

### 1.2.3.1.4. La consistance :

Au moment du prélèvement, il est possible d'apprécier si les colonies sont grasses, crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes), sèches ou encore muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes).

### 1.2.3.1.5. La couleur et/ou pigment :

Plusieurs colonies n'ont pas une couleur bien définie (blanc, gris). Par contre, certaines bactéries produisent un pigment insoluble qui donnent un aspect bien caractéristique à la colonie (rose, jaune, rouge ...), tandis que d'autres produisent un pigment soluble qui diffuse et colore le milieu (Avril, 2007).

## 1.2.4. Dénombrement des Germes totaux :

Le dénombrement des germes totaux inclut toutes les cellules végétatives et les spores des bactéries, les levures et les moisissures qui peuvent pousser à une température donnée sur ou dans un milieu de culture donné. Les microorganismes strictement mésophiles ont une température optimale de 30-37°C. Leur dénombrement est déterminé sur un milieu de gélose nutritive (GN) sans inhibiteurs dans le but de favoriser le développement à 30°C/24h de tous les germes.

### 1.2.4.1. Isolement :

Aseptiquement, nous transférons 1ml de la solution mère dans des boîtes de Pétri stériles à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Nous répétons l'opération avec les autres dilutions s'il le faut. Nous versons dans chaque boîte de Pétri environ 18ml de gélose nutritive préalablement préparée, fondue et refroidie, placée à une température de 45±1°C. Puis, nous mélangeons soigneusement l'inoculum. Nous laissons solidifier puis nous incubons à 37°C pendant 24h (Delarras, 2014).

### 1.2.4.2. Lecture :

Après le temps d'incubation, nous comptons le nombre des colonies de chaque boîte.

### 1.2.5. Dénombrement des staphylocoques :

*Staphylococcus aureus* est une bactérie de la famille des Micrococcaceae. Il a une forme sphérique (coque) de 0,5 µm à 1,5 µm de diamètre. Ces coques à Gram positif se présentent généralement en grappes, par paires ou en cellules individuelles compte tenu de l'âge de la culture. C'est une bactérie immobile, asporulée et aérobie facultatif possédant une catalase (**Rapport du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 2016**). Le milieu Chapman contient de fortes concentrations des chlorures de sodium (75 g/l<sup>-1</sup>) qui jouent le rôle d'inhibiteur pour les autres bactéries et de ce fait il est considéré comme un milieu sélectif pour les *Staphylococcus* tolérant ces fortes concentrations en NaCl. La fermentation du mannitol est déterminée suite au virage au jaune de l'indicateur coloré, le rouge de phénol, autour des colonies [6].

#### 1.2.5.1. Ensemencement sur Chapman :

L'ensemencement doit être réalisé par étalement.

##### ✓ Lecture :

L'utilisation du mannitol se traduira par une acidification du milieu, provoquant le virage au jaune de l'indicateur de pH.

Les colonies mannitol + sont entourées d'une auréole jaune. L'utilisation du mannitol est un caractère discriminatif important ce genre. *Staphylococcus aureus* étant mannitol +. Ne pas confondre la pigmentation des colonies et le virage de l'indicateur coloré. Ainsi des colonies pigmentées en jaunes et mannitol + : forte suspicion de *S. aureus* [6].



**Photo 6.** Aspect du chapman après incubation (**Leminor et al., 1992**)

#### 1.2.5.2. Coloration de Gram :

L'examen microscopique après une coloration de Gram nécessite au départ une préparation d'un frotti bactérien. Une colonie bien isolée d'une culture en milieu solide est prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau distillée stérile et séchée par passage sur

la flamme du bec Bunsen. L'observation se fait à l'objectif (X100). Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères :

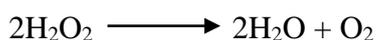
- Leur forme (bacille, cocci,...etc.),
- Leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif. Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consiste à :

- 1- Fixer de frottis.
- 2- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet. Laisser agir 1 minute.
- 3- Rejeter le colorant. Laver à l'eau.
- 4- Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir 1 minute.
- 5- Rejeter le Lugol. Laver à l'eau.
- 6- Décolorer à l'alcool 95°.
- 7- Rincer à l'eau courante.
- 8- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir quelques secondes et rejeter la Fuchsine.
- 9- Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres (**Dégrément, 1998**).

**Résultats :** Après ce traitement, les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet et les bactéries Gram négatif sont colorées en rose (**in Boukrouma, 2008**).

#### 1.2.5.3. Test catalase :

La catalase est une enzyme qui permet à la bactérie de dégrader l' $H_2O_2$  toxique par la réaction suivante :



Les staphylocoques (catalase positive) et les streptocoques (catalase négative) peuvent être différenciés par ce test. Les germes producteurs de catalase peuvent dissocier le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (**in Bendimerad, 2010**).

✓ **Technique :**

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée.
- Observer immédiatement.

✓ **Lecture :**

- Apparition de bulles, dégagement gazeux de dioxygène : catalase (+)
- Pas de bulles : catalase (-) (**in Bendimerad, 2010**)



**Photo 7.** Aspect du test catalase positive (in Bendimerad, 2010).

#### 1.2.5.4. Test coagulase :

L'activité de la coagulase du *Staphylococcus aureus* sur le plasma humain de groupe O a été prise comme un critère principal pour différencier les espèces de genre *Staphylococcus* à coagulase positif des autres espèces du genre *Staphylococcus* à coagulase négatif (SCN) (in Bendimerad, 2010).

✓ **Technique :**

Dans un tube à hémolyse stérile, introduire 0,5 ml de plasma oxalaté + 0,5 ml d'une culture de 18 h en bouillon nutritif de la souche à étudier. Dans un autre tube à hémolyse stérile introduire 0,5 ml d'une même culture comme témoin. Placer le mélange et le tube témoin à 37°C. Les lectures doivent être effectuées toutes les heures au moins pendant les cinq premières heures.

✓ **Lecture :**

- Coagulation du plasma => Coagulase (+) => *Staphylococcus aureus*.
- Pas de coagulation du plasma => Coagulase (-) [7].



**Photo 8 :** Aspect du test coagulase positive [7].



**Photo 9 :** Aspect du test coagulase négatif [7].

#### 1.2.5.5. API Staph :

L'API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria* comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données. La liste complète des bactéries qu'il est possible d'identifier avec ce système est présente dans le Tableau d'Identification [8].

✓ **Principe :**

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces

réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification.

#### **Mode opératoire :**

- Préparer une suspension bactérienne homogène dans une ampoule de l'API Staph Medium d'opacité égale à 0,5 de Mac Farland, Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures). Cette suspension doit être utilisée extemporanément.

-A l'aide d'une pipette Pasteur stérile remplir les tubes de la galerie avec API Staph Medium ensemencé.

-Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.

-Renfermer la boîte d'incubation.

-Incuber à  $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 heures.

#### ✓ **Lecture de la galerie :**

Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant une goutte de chacun des réactifs suivants :

-Test VP : VP 1 et VP 2.

Attendre 10 minutes. Une couleur rose franche ou violette indique une réaction positive. Une couleur rose pâle ou rose claire obtenue après 10 minutes doit être considérée négative.

- Test NIT : NIT 1 et NIT 2. Attendre 10 minutes. Une coloration rouge indique une réaction positive.

- Test PAL : ZYM A et ZYM B. Attendre 10 minutes. Une coloration violette indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API Staph [9].

#### **1.2.6. Dénombrement des Enterobacteriaceae :**

Toujours près de la flamme, nous transférons à l'aide d'une pipette stérile Pasteur stérile 0.25 ml (cinq gouttes séparés) de la suspension mère (dilution  $10^{-1}$ ) à la surface de boîte de milieu sélectif gélosé (Hektoen). On répète l'opération avec la dilution  $10^{-2}$  et les dilutions suivantes si nécessaire.

Nous étalons soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu gélosé (Hektoen) puis on incube à  $37^{\circ}\text{C}$  durant 18 à 24h.

### ❖ **Lecture :**

Sur gélose, les colonies sont lisses et régulières et atteignent 2 millimètres de large sauf celles des *Yersinia*, qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et à y former un tapis uniforme [10].

### **1.2.6.1. Coloration de Gram :**

La coloration de Gram est aussi à réaliser pour les Entérobactéries.

### **1.2.6.2. API 20E :**

La galerie API 20 E est un système pour l'identification des Entérobactéries et autres bacilles Gram négatif, en utilisant 20 tests biochimiques standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

#### ✓ **Principe :**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les tests sont inoculés avec une suspension bactérienne. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

#### ✓ **Mode opératoire :**

L'opération s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP, GEL, avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

(Il est important de veiller à ne pas créer de bulles lors de l'inoculation qui pourraient fausser le résultat).

#### ✓ **Lecture :**

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positifs : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

- Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.
- Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.

- Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kovacks. Un anneau rouge obtenu en 2 minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E. (in **Aouissi et al., 2007**).



**Photo 10.** La galerie API 20 E (Photo personnelle)

### 1.2.7. Recherche des salmonelles :

Le genre *Salmonella* peut se définir ainsi : genre regroupant des Bacilles à Gram négatif habituellement mobiles par des cils péritriches ; des mutants immobiles peuvent être rencontrés et un sérotype (*S. pullorum-gallinarum*) est toujours immobile.

Les *Salmonella* cultivent sur milieux ordinaires, les colonies ayant en général de 2 à 4 mm de diamètre sauf pour certains sérotypes (*S. abortus equi*, *S. typhi-suis*) qui produisent de petites colonies (1mm) (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

#### 1.2.7.1. Première technique :

La gélose SS a été ensemencé par la technique de stries à partir de la solution mère  $10^{-1}$  et mise en incubation à l'étuve à 37°C.

#### 1.2.7.2. Deuxième technique :

La recherche de *Salmonella* a été faite en 4 étapes : le pré-enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et enfin l'identification (**Ndao, 1994**).

#### 1.2.7.3. Pré-enrichissement :

Différentes parties de chaque échantillon de la crème glacée sont prélevées de façon aseptique et directement misent dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée, ce mélange est incubé à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant  $24 \pm 3$ h. Le pré-enrichissement permet la croissance des salmonelles soumises à un stress ou endommagées par des facteurs comme l'exposition à la chaleur, la congélation, la déshydratation, les agents de conservation, une forte pression osmotique ou d'importantes fluctuations de température (**Silue, 2005**).

#### 1.2.7.4. Enrichissement :

Deux millilitres de la solution du pré-enrichissement sont introduits dans un tube contenant dix-huit ml de bouillon au sélénite (S.F.B). Après homogénéisation, le mélange est étuvé à 37°C pendant 24 heures.



**Photo 11.** Enrichissement à partir du milieu SFB (Photo personnelle)

#### 1.2.7.5. Isolement :

Une gélose sélective SS a été utilisée. Elle est ensemencée par technique de stries à partir d'un bouillon d'enrichissement et mis en incubation à l'étuve à 37°C.

#### 1.2.7.6. Lecture :

Après 24 heures, les colonies isolées sur les géloses présentant les caractéristiques macroscopiques des salmonelles (colonies incolores à centre noir sur SS).



**Photo 12.** Gélose SS avant incubation (Silue, 2005).



**Photo 13.** Gélose SS après incubation (Présence de *salmonella*) (Silue, 2005).

#### 1.2.7.7. Identification :

- **Test TSI (Triple Sugar Iron Agar) :**

Le test TSI a été ensemencé à partir des milieux SS (ceux qui ont été ensemencé à partir de la solution mère et ceux à partir du milieu S.F.B). Le but de ce test est de mettre en évidence cinq caractères :

- Fermentation du Glucose
- Fermentation du Lactose

- Fermentation du Saccharose
- Production de Gaz
- Production d'hydrogène sulfureux (H<sub>2</sub>S) (**Lebres, 2002**).

Le milieu de TSI est un milieu gélosé contenant du glucose, du lactose, du saccharose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH, le rouge de phénol. Ce milieu est reparti en tubes à essai sous forme semi-inclinée avec un haut culot et une petite tranche. Il est ensemencé par piqûre profonde du culot au fil droit et par ensemencement en stries de la tranche. Après une période de 24 h à 37°C le milieu est examiné. Dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation du glucose qui entraîne une acidification et virage au jaune de l'indicateur. Sur la tranche, l'aérobiose favorise l'utilisation du lactose qui entraîne le virage au jaune de l'indicateur.

L'acidification due au glucose, qui est en faible quantité, est neutralisée rapidement à ce niveau par l'alcalinisation provenant de la dégradation des peptones.

L'acidification de la tranche indique donc bien l'utilisation du lactose.

L'apparition des bulles dans le culot traduit la production du gaz, et d'un noircissement dû à la formation du sulfure de fer traduit celle de H<sub>2</sub>S. Ce milieu sert aussi à la pratique des réactions à la β-galactosidase et la lysine décarboxylase(LDC). Ce milieu permet de différencier les *Salmonella* et *Shigella* [lactose(-), saccharose (-)] de la plupart des autres (**in Bengati et al., 2011**).

### 1.2.8. Recherche des *listeria* :

*Listeria* un petit bacille (0,5 - 2 µm x 0,5 µm), Gram positif, isolé ou en chaînettes, mobile à 20-25 °C, non sporulé, aéro-anaérobie facultatif, catalase positive sauf de rares souches, hydrolysant l'esculine, oxydase négative, *Listeria* fermente de nombreux glucides sans production de gaz (**Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement, Travail, 2011**).

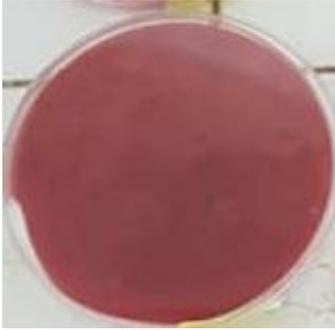
#### 1.2.8.1. Isolement :

Cinq gouttes de la solution mère (dilution 10<sup>-1</sup>) sont disposées sur la gélose au sang et sont ensemencés à l'aide d'un râteau puis incubation à 37degré durant 24heurs (± 2 heures).

#### 1.2.8.2.Lecture :

Sur ce milieu les colonies de *Listeria* apparaissent au bout de 24 heures sous forme de colonies grises ou gris verdâtre luisantes, de un mm de diamètre environ, entourées d'un halo

brun noir. Après 48 heures, le diamètre devient de 2 mm, les colonies sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale (Leminor et al., 1992).



**Photo 14.** Gélose au sang avant incubation (Photo personnelle).



**Photo15.** Gélose au sang après incubation (Présence de *Listeria*) (Leminor et al., 1992).

### III. Étude de la sensibilité aux antibiotiques :

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées est fondée sur l'étude de leurs antibiogrammes.

#### 1. Antibiogramme :

La méthode de base (antibiogramme simple) est une pratique au laboratoire pour obtenir des données cohérentes quant à la résistance des bactéries aux antibiotiques prescrits en médecine praticienne. Les modalités techniques les plus utilisées sont représentées par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de disques) (Eyquem et al., 2000).

➤ **Principe :**

Le test de sensibilité des souches vis-à-vis douze antibiotiques a été déterminé par la méthode de diffusion sur gélose Mueller-Hinton (MH) (OMS, 2005).

**Tableau 3.** Les antibiotiques utilisés

Famille d'antibiotique	Antibiotique	L'abréviation	La charge du disque
Aminopénicilline	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC	25/10
Aminopénicilline	Ampicilline	AMP	10
Phénicolés	Chloramphénicol	C	30

Quinolones	Ciprofloxacine	CEP	30
Céphalosporine 3ème génération	Céfixime	CFM	5
Céphalosporine 3ème génération	Ceftriaxone	CRO	30
Aminosides	Gentamicine	HLG	8
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne	NO	30
Pénicillines	Oxacilline	OX	1
Benzyl-Pénicillines	Pénicilline G	P	10
Pénicillines	Pipéracilline	PC	100

### 1.1. Technique :

#### 1.1.1. Ensemencement :

Nous coulons la gélose Mueller-Hinton (MH) dans des boîtes de Pétri et nous laissons refroidir sur la paillasse. Ces boîtes de gélose (MH) sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une suspension bactérienne (onze tubes ont été préparés à partir des cultures des Enterobacteriaceae) correspondant à 0.5 Mac Farland. Mettre à l'étuve pendant 2h.

#### 1.1.2. Application des disques :

Les disques d'antibiotiques y sont déposés à l'aide d'une pince stérile sur la gélose selon la méthode illustrée dans la photo N°18. Nous laissons les boîtes environ 20 min à température ambiante pour permettre une pré-diffusion des antibiotiques, puis nous incubons à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 h.



**Photo 16.** Disposition des antibiotiques sur les boîtes MH (Photos personnelles).

### 1.1.3. Lecture :

À l'aide d'une règle, les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés (**Ndao, 1994**) et l'interprétation en Sensible (S), Intermédiaire (I) ou Résistante (R) est effectuée selon les normes de l'OMS (2005).

# Chapitre IV

## Résultats et discussion

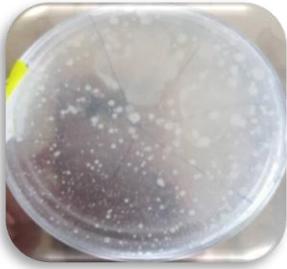
Au cours de notre étude réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la DSP de la wilaya de Guelma, nous avons réalisé un contrôle microbiologique de onze échantillons de glaces ainsi que l'étude de la résistance aux antibiotiques des souches isolées. Des colonies de différents aspects macroscopiques et microscopiques ont été isolées.

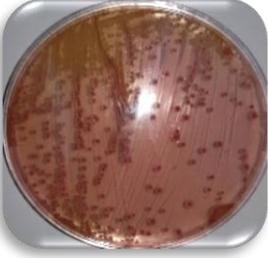
**1. Aspect macroscopique :**

Lorsque nous ensemençons une bactérie sur une gélose, elle n'est pas visible. Toutefois, elle se divise à un rythme assez important pour former une colonie visible à l'œil nu. Chaque colonie est formée par des millions de bactéries identiques. Cette colonie possède des caractéristiques propres à l'espèce bactérienne (clone).

Après un temps d'incubation de 18 à 24 heures à 37°C, l'examen macroscopique des colonies qui ont poussées sur les milieux gélosés utilisés (Gélose Nutritive, Chapman, Hektoen, Gélose SS et Gélose au sang) est résumé dans le tableau suivant :

**Tableau 4.** Résultat de lecture macroscopique des échantillons N° 3, 5, 6,7, 9 et 11.

<b>Milieu de culture</b>	<b>Couleur et aspect des colonies</b>	<b>La taille</b>	<b>La forme</b>
<p><b>Gélose nutritive</b></p> 	Colonies blanches lisses	Petites, Grandes et Moyennes	Irrégulière bombée
<p><b>Gélose Héктоen</b></p> 	Colonies orangés rugueuses	Grandes et Moyennes	Arrondie et Irrégulière plate
	Colonies vertes lisses	Moyennes et petites	Arrondie bombée

<p><b>Gélose SS</b></p>  	Colonies rouges lisses	Moyenne	Arrondie bombée
	Colonies blanches rugueuses	Moyenne et petite	Irrégulière plate
	Culture négative	Culture négative	Culture négative
<p><b>Chapman</b></p>  	Colonies jaune avec virage de couleur	Moyennes, petites	Régulières, bombé et arrondies
	Colonies blanches lisses		
<p><b>Gélose au sang</b></p> 	Culture négative	Culture négative	Culture négative

**2. Dénombrement sur milieu solide :**

Nous avons dénombré les colonies bactériennes sur les différents milieux de culture. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 5.** Résultat du dénombrement des différentes flores bactériennes (UFC/ml).

Milieu de culture Code d'échantillon	Gélose nutritif	Hektoen	Chapman
1	28 .10 <sup>4</sup>	9,2.10 <sup>4</sup>	/
2	24.10	/	/
3	11,2 .10 <sup>4</sup>	35,2.10 <sup>4</sup>	83,2. 10 <sup>3</sup>
4	42 .10 <sup>3</sup>	0,3776.10 <sup>4</sup>	6,656.10 <sup>3</sup>
5	11,2.10 <sup>2</sup>	16,48.10 <sup>4</sup>	0.028.10 <sup>3</sup>
6	26.10 <sup>3</sup>	14,08.10 <sup>4</sup>	4.10 <sup>3</sup>
7	12.10 <sup>2</sup>	0,2720.10 <sup>4</sup>	/
8	23. 10	0,0192.10 <sup>4</sup>	0,440.10 <sup>3</sup>
9	82.10 <sup>6</sup>	0,0420.10 <sup>4</sup>	0,304.10 <sup>3</sup>
10	22. 10	0,0064.10 <sup>4</sup>	0.608.10 <sup>3</sup>
11	84.10 <sup>6</sup>	0,1672.10 <sup>4</sup>	/

En se basant sur les normes qui fixent les critères microbiologiques des denrées alimentaires, publiées dans le Journal Officiel de la République Algérienne (**JORA, 2017**), l'interprétation des résultats est faite selon un plan à deux classes. Les unités d'échantillonnage présentant un nombre de microorganismes inférieur à la norme « m » sont bonnes qualités (satisfaisants) et les unités renfermant plus que la valeur de « m » sont non satisfaisants.

**Tableau 6.** Niveau de contamination par les germes totaux

échantillons	Normes UFC/ml	satisfaisant		Non satisfaisant	
		Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Crèmes glacées	10 <sup>6</sup>	9	81.81%	2	18.18%

**Tableau 7.** Niveau de contamination par les Entérobactéries

échantillons	Normes UFC/ml	satisfaisant		Non satisfaisant	
		Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Crèmes glacées	5.10 <sup>2</sup>	4	36,36%	7	63,63%

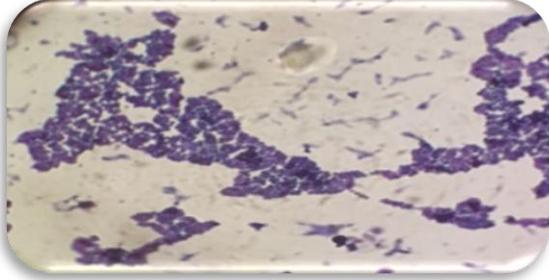
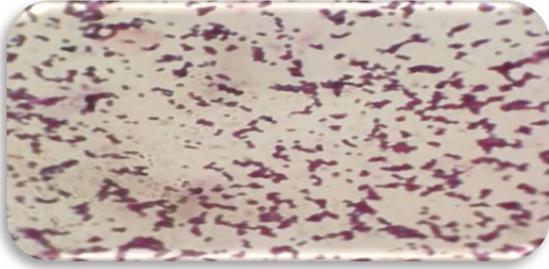
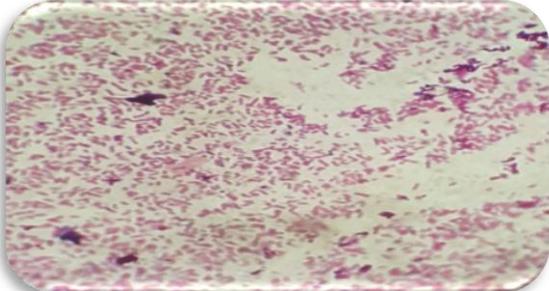
**Tableau 8.** Niveau de contamination par les staphylocoques

échantillons	Normes UFC/ml	satisfaisant		Non satisfaisant	
		Nombre	Pourcentage	Nombre	Pourcentage
Crèmes glacées	10 <sup>2</sup>	5	45.45%	6	54.54%

### 3. Aspect microscopique :

Après coloration différentielle de Gram nous avons isolé des cocci et des bacilles. Du point de vue microscopique l'examen cytologique nous a révélé que la majorité des bactéries du milieu Hektoen sont des bacilles Gram négatif et quelques bactéries du milieu Chapman sont des cocci Gram positif. Le tableau N°9 montre l'aspect microscopique de quelques bactéries isolées sur les milieux utilisés.

Tableau 9. Résultat de la coloration de Gram.

Culture	Aspect macroscopique des colonies	Observation microscopique des colonies (G×100 a immersion)
Chapman	Bombée, lisse, à contour régulier, blanches avec virage de couleur du milieu entourant les colonies au jaune brillant.	 <p><b>Photo 17.</b> Aspect des Cocci Gram+ (grappe des raisins) <b>(personnelle).</b></p>
	Bombée, lisse, à contour régulier, jaunâtre avec virage de couleur du milieu entourant les colonies au jaune brillant.	 <p><b>Photo 18.</b> Aspect des cocci Gram+ (grappe des raisins) <b>(Photo personnelle).</b></p>
Hektoen	Grandes colonies bombées, lisses à contours réguliers, orangées avec virage de couleur du milieu entourant les colonies à orangé.	 <p><b>Photo 19.</b> Aspect des bacilles Gram – <b>(Photo personnelle)</b></p>



**4.2.Résultats du test catalase :**

**Tableau 11.** Résultat du test catalase

Échantillon	Milieu de culture	Test catalase
6	Chapman	+
8	Chapman	+
9	Chapman	+
10	Chapman	+



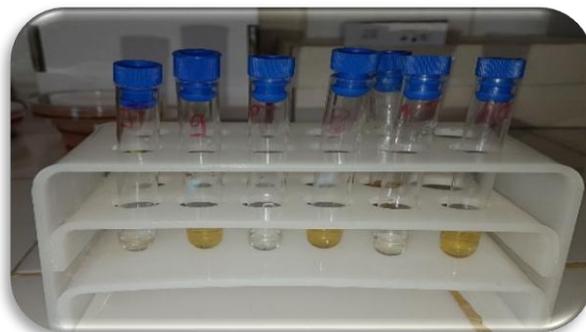
**Photo 21.** Résultat du test catalase (personnelle).

**4.3.Résultat du test Coagulase :**

Les staphylocoques à coagulase positive sont les bactéries qui se présentent sous forme de cocci à Gram positive, sphériques, isolées ou regroupées formant ainsi des grappes de raisin, ils sont aérobies ou anaérobies facultatifs, possédant l'enzyme catalase et la coagulase, La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. Les résultats du test coagulase sont représentés dans le tableau ci-dessus.

**Tableau 12.** Résultat du test coagulase

Échantillon	Milieu de culture	Observation
6	Chapman	-
8	Chapman	-
9	Chapman	-
10	Chapman	-



**Photo 22.** Résultat du test coagulase avec le tube témoin (Photo personnelle).

**5. Identification biochimique :**

**5.1.Résultat de la Galeries API 20E :**

L'étude biochimique nous a permis d'identifier à partir du milieu Hektoen, dix espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Les résultats des plaques API 20E sont déterminés dans le tableau ci-dessous.

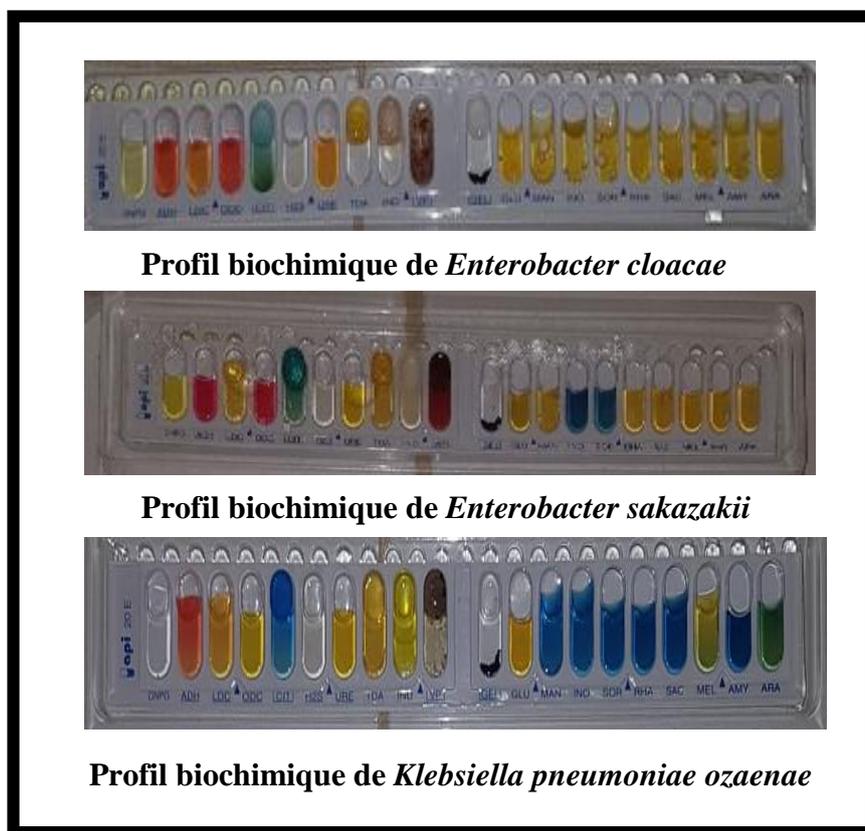
**Tableau 13.** Résultats des plaques API 20E, des dix souches sélectionnées.

Souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H2S	URE	TDA	IND	V P	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
1	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
6	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
8	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+/-	-	+	+	+	+	+
11	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nous remarquons la présence majoritaire de *Enterobacter cloacae*, la présence de deux espèces de *Klebsiella pneumoniae ozaenae* et deux espèces de *Enterobacter sakazakii*. Cette dernière est une espèce pathogène qui cause une méningite, une cérébrite et une entérocolite nécrosante. Les résultats sont représentés dans le tableau N°14.

**Tableau 14.** Résultat de la galerie API 20E

Code de l'échantillon	Milieu de purification	Espèce identifié
1	Hektoen	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i> 100%
3	//	<i>Enterobacter cloacae</i> 79,7%
4	//	<i>Enterobacter cloacae</i> 79,7%
5	//	<i>Klebsiella pneumoniae ozaenae</i> 99,6%
6	//	<i>Enterobacter cloacae</i> 79,7%
7	//	<i>Enterobacter cloacae</i> 98,9%
8	//	<i>Enterobacter sakazakii</i> 51,1%
9	//	<i>Enterobacter cloacae</i> 94,5%
10	//	<i>Enterobacter sakazakii</i> 98,2%
11	//	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i> 35,9%



**Photo 23.** Résultats des profils biochimiques des entérobactéries (**Photos personnelles**).

### 5.2. Résultat de la Galeries API Staph

L'étude biochimique nous a permis d'identifier à partir du milieu Chapman trois espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterococcaceae. Les résultats des plaques API Staph sont déterminés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 15.** Résultats des plaques API Staph, des quatre souches sélectionnées.

Souches	O	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
6	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-
8	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	-
9	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-
10	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+/-	-	-	-	+	-	+	-	-

Les résultats sont représentés dans le tableau qui suit. Notons que l'espèce *Staphylococcus sciuri* domine de loin.

Tableau 16. Résultat de la galerie API Staph.

Code de l'échantillon	Milieu de purification	Espèce identifié
6	Chapman	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 52.8%
8	//	<i>Staphylococcus capitis</i> 68.2%
9	//	<i>Staphylococcus sciuri</i> 96.1%
10	//	<i>Staphylococcus sciuri</i> 96.1%

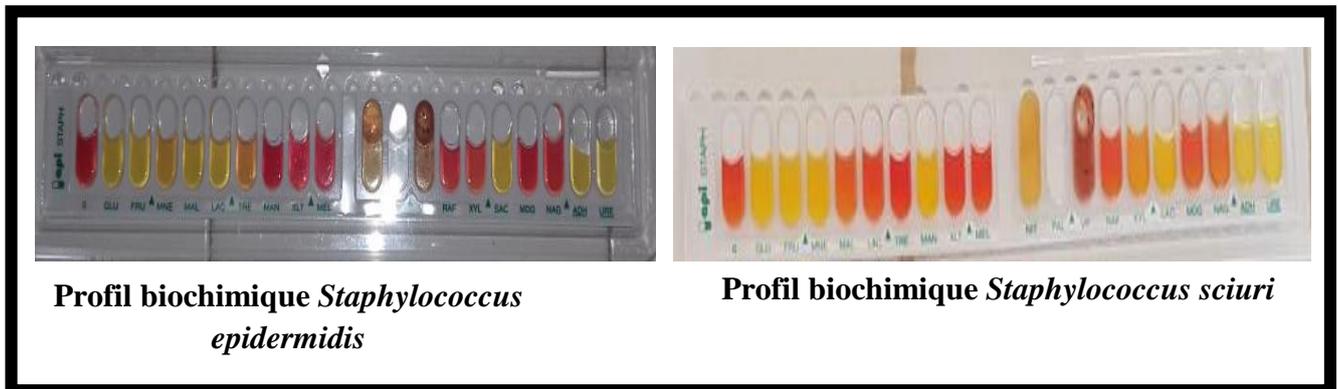


Photo 24. Résultats des profils biochimiques des Staphylocoques (Photos personnelles).

## 6. Antibiogramme :

Après incubation sur milieu Muller-Hinton à 37C° pendant 24h, nous avons obtenus les résultats suivants :

**Tableau 17.** Résultat de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques

Antibiotiques Souches	AMC	AMP	C	CEP	CFM	CRO	HLG	NO	OX	P	PC
	1	/	6 = <b>R</b>	26 <b>S</b>	36 <b>S</b>	/	/	34 <b>S</b>	26 <b>S</b>	/	6 = <b>R</b>
3	/	-	-	-	/	/	-	-	/	-	-
4	/	6 = <b>R</b>	33 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	/	/	26 <b>S</b>	26 <b>S</b>	/	6 = <b>R</b>	16 <b>I</b>
5	/	6 = <b>R</b>	26 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	6 = <b>R</b>	/	/	<b>16</b> <b>I</b>	/	6 = <b>R</b>	6 = <b>R</b>
6	26 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	48 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	/	/	/	41 <b>S</b>	/	6 = <b>R</b>	24 <b>S</b>
7	-	-	-	-	/	/	/	-	/	-	-
8	/	6 = <b>R</b>	33 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	/	6 = <b>R</b>	/	34 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	/	6 = <b>R</b>
9	/	-	-	-	/	10 <b>R</b>	/	31 <b>S</b>	-	/	14 <b>I</b>
10	/	-	-	-	/	26 <b>S</b>	/	6 = <b>R</b>	-	/	10 <b>R</b>
11	/	6 = <b>R</b>	23 <b>I</b>	6 = <b>R</b>	/	10 <b>R</b>	/	30 <b>S</b>	6 = <b>R</b>	/	17 <b>I</b>
<b>R</b> : Résistante <b>S</b> : sensible <b>I</b> : Intermédiaire											

**AMC** : Amoxicilline, **CRO** : Ceftriaxone, **PC** : Pipéracilline, **AMP** : Ampicilline, **HLG** : Gentamicine, **C** : Chloramphénicol, **NO** : Nitrofurantoïne, **CEP** : Ciprofloxacine, **OX** : Oxacilline, **CFM** : Céfixime, **P** : Pénicilline.

La photo N°28 représente les résultats des antibiogrammes réalisés au niveau du laboratoire.

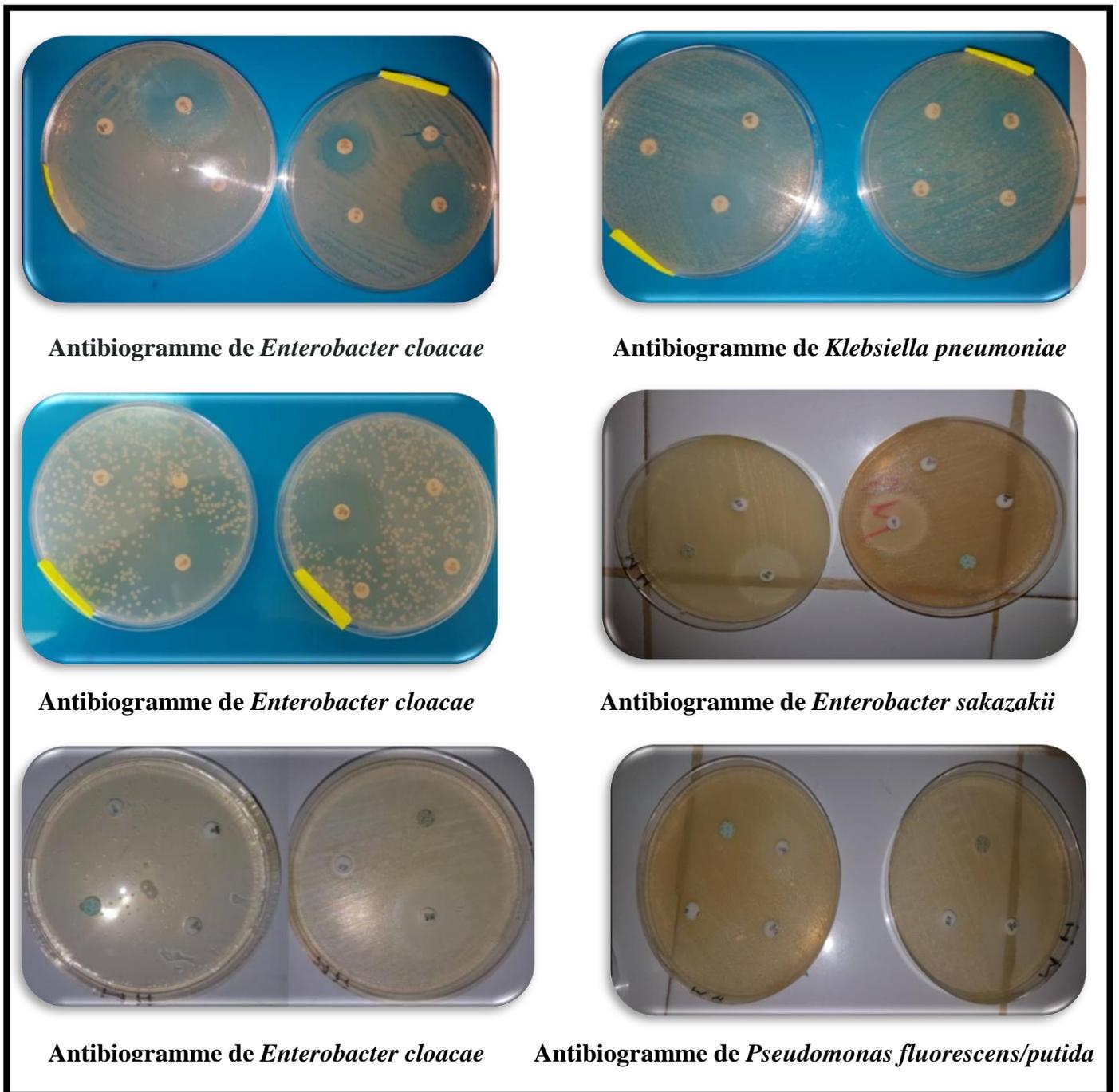


Photo 25. Résultats des antibiogrammes (Photos personnelles)

# Discussion

### Discussion :

La production des glaces et des crèmes glacées au moyen de procédés semi-industriels ou artisanaux consiste à mélanger un certain nombre d'ingrédients (lait, eau, crème, sucre, œufs, stabilisant et parfums) et faire subir à ce mélange une pasteurisation suivie de la maturation et du foisonnement (avec introduction d'air) du produit (Massa *et al.*, 1989). Les crèmes glacées sont constituées de divers produits. Ces derniers nutritifs et au goût agréables constituent un milieu très favorable à la prolifération microbienne. La surveillance de la qualité microbiologique des crèmes glacées est une nécessité afin de garantir leur innocuité et prévenir la survenue de toxi-infection collectives (El Ouali Alami *et al.*, 2013).

Cette étude a été réalisée au laboratoire d'hygiène de la Direction de la Santé et de la Population de la wilaya de Guelma dans le but d'évaluer la qualité microbiologique des échantillons de crèmes glacées vendus au publique. Les échantillons au nombre de onze ont été ramenés de onze crèmeries différentes de la ville de Guelma.

L'analyse macroscopique des bactéries isolées a montré une grande variété de formes et d'aspects des colonies qui ont poussées sur les cinq géloses utilisées pour l'isolement (la gélose nutritive, la gélose Chapman, la gélose Hektoen, la gélose SS et gélose au sang). L'aspect microscopique des souches après coloration de Gram a révélé la présence des cocci associés en grappe de raisin à Gram positif isolés à partir des colonies obtenu du milieu Chapman et des bacilles associés en paire ou associés en courtes chaînes à Gram négatif isolés à partir des colonies ayant poussés sur gélose Hektoen.

La flore mésophile aérobie totale correspond à un bon nombre de microbes qui se développent à température ambiante (entre 30°C et 37°C). Elle permet d'évaluer la charge bactérienne globale présente dans un aliment. Cette flore constitue donc un bon indicateur pour ce qui est de l'application des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène.

L'étude biochimique réalisée par deux types du système Biomérieux (API 20 E, API Staph) nous a permis d'identifier sept espèces bactériennes dont trois appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, une à la famille des Pseudomonadaceae et trois à les Enterococcaceae. D'une manière générale, les Entérobactéries sont dominants. Ils sont observés sur la plupart des échantillons de la crème glacée, l'espèce la plus représentée est *Enterobacter cloacae*. La présence d'une espèce appartenant au genre *Pseudomonas* est aussi importante à signaler. La présence des Entérobactéries témoigne une contamination fécale, du fait qu'ils sont de bactéries commensales du tractus gastro-intestinal des humains comme elles peuvent être retrouvées dans l'eau (Philippon, 2001).

Les salmonelles étant l'agent pathogène le plus fréquemment incriminé dans les toxi-infections alimentaires. Leur recherche est systématiquement réalisée dans toutes les denrées alimentaires. Leur présence est à déclaration obligatoire auprès des services de santé quel que soit le type d'aliment. Leur prospection dans nos échantillons des crèmes glacées n'a révélé aucun cas de contamination, contrairement à d'autres études qui ont montré un taux de contamination de 6.8% en Turquie (**Yaman et al., 2006**), de 5% en Lybie (**Bttelheim, 2007**), et de 5% au Cameroun (**Wouafo et al., 1996**). Ceci est dû probablement au nombre réduit de nos échantillons.

Aussi, sur les onze échantillons analysés nous avons aussi isolés et identifiés de nombreuses autres espèces bactériennes appartenant à la famille des Enterococcaceae. Au niveau des crèmeries de la ville de Guelma, le plus abondant est *Staphylococcus sciuri*, avec la présence de deux autres espèces soit *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus capitis*. Leur présence témoigne d'un manque d'hygiène lors de la manipulation de ces produits, vu que c'est une flore commensale de la peau, des cheveux, du nez et de la gorge de l'être humain comme elle peut se développer sur les surfaces non propres sur lesquelles les denrées sont préparées (**Flandrois, 2000**).

L'hygiène corporelle des vendeurs est moyenne ou mauvaise, un manque d'hygiène des locaux de préparation ou de vente et des ustensiles utilisés est flagrant. La majorité des vendeurs ne portaient ni coiffe, ni blouses ni des paires de gants. D'autre part, ces crèmes glacées sont vendues en petites portions à partir de grands récipients en vrac qui chez certains commerçants sont exposés directement à l'air libre.

Ces modestes données de notre étude nous ne permettent pas d'affirmer et d'appréhender le mode de contamination des aliments ni d'incriminer l'un de ses constituants comme responsable de la contamination initiale car il peut s'agir de l'eau utilisée, du matériel de préparation ou même des manipulations et manipulateurs. Dans ce cas, il serait intéressant de suivre et d'étudier les différentes phases de préparation pour déterminer les points critiques qui peuvent faire l'objet d'une surveillance, autrement dit de mettre en place un contrôle des lignes de production de crèmes glacées par l'application d'un système HACCP (Hazard Analyzis Critical Control Point) (**Kruyet et al., 2001**).

L'acquisition de la résistance chez les bactéries d'origine alimentaire est un phénomène mondial très largement rapporté avec des taux relativement stables (**Tassewet et al., 2013**). Les antibiotiques testés dans notre étude sont au nombre de douze. Ils sont classés selon l'ordre pharmacologique suivant : Aminopénicilline, Phénicolés, Céphalosporine 3<sup>ème</sup> génération, Nitrofuranes, Pénicillines, Benzyl-Pénicillines, aminoglycosides, quinolones de deuxième

génération. Dans ce travail, nous avons étudié le profil de résistance de toutes les souches des Enterobactéries et une *Pseudomonas* isolées à partir des crèmes glacées. Ainsi, toutes les bactéries sont résistantes à l'Ampicilline (un des antibiotiques les plus couramment utilisés pour le traitement en médecine humaine et en vétérinaire) [11] et la plupart sont sensibles au Chloramphénicol.

L'étude épidémiologique rétrospective est très intéressante pour comparer nos résultats et déterminer les principales bactéries incriminées dans ces toxi-infections alimentaires touchant principalement les enfants. Malheureusement, l'accès très difficile aux anciens registres des analyses au niveau de la DSP a entravé notre approche et notre étude.

# Conclusion et perspectives

### Conclusion :

Dans cette étude réalisée au niveau du laboratoire d'hygiène de la DSP (Direction de la Santé et de la Population) de la wilaya de Guelma, nous avons essayé d'isoler et d'identifier les principales bactéries dans les crèmes glacées vendues au public. Ces dernières sont responsables de plusieurs intoxications alimentaires principalement chez les enfants. Onze échantillons ont été récoltés à partir de onze crèmeries exerçant dans la ville de Guelma.

Nous avons vérifié la qualité hygiénique des crèmes glacées par la réalisation des analyses microbiologiques de routine (germes aérobie à 30°C, recherche des staphylocoques à coagulase positif, des Enterobacteriaceae : *Salmonella* et des *Listeria monocytogenes*). Ces analyses ont pour but de mettre en évidence les présences ou non des microorganismes qui modifient les propriétés nutritionnelles ou hygiéniques de ces crèmes glacées. L'existence de ces microorganismes d'altérations ou des microorganismes pathogènes ne peut pas être tolérée car elles présentent un risque majeur pour la santé de consommateur. Ainsi, les principales bactéries isolées de ces échantillons sont : *Klebsiella pneumoniae* ssp *ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis* et *Staphylococcus epidermidis*. L'étude de leurs sensibilités aux antibiotiques a montré que la majorité de ces bactéries isolées ont une résistance importante vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés.

D'une manière générale et à partir des modestes résultats obtenus au cours de notre étude, il en ressort que la majorité des crèmes glacées analysées sont conformes aux normes, exception faite pour certains échantillons qui sont de très mauvaises qualité bactériologique et donc impropre à la consommation humaine. Cependant pour pallier à ce problème, la prévention, la sensibilisation et le respect des règles d'hygiène restent les meilleurs moyens pour maîtriser cette qualité microbiologique. Le matériel de fabrication doit être régulièrement lavé à l'eau courante, désinfecté et rincé pour enlever les traces d'antiseptiques. Il est extrêmement important de veiller à la propreté et à l'état sanitaire des personnes qui fabriquent et qui distribuent les glaces (les vendeurs) : les rhumes, les blessures et l'état infectieux des mains sont les principales sources de contamination.

A la fin, il est recommandé et il serait préférable de continuer ce travail en poussant plus les analyses microbiologiques pour vérifier la qualité des crèmes glacées et de contrôler la composition chimique et toxicologique de ces produits. L'étude rétrospective est aussi à faire car elle constitue un bon moyen de suivi de l'épidémiologie de ces produits à large consommation surtout en période estivale.

Afin de prévenir les toxi-infections alimentaires liées aux crèmes glacées, il serait intéressant de :

- Réaliser le contrôle de l'eau de rinçage
- Contrôler et maîtriser la chaîne du froid
- Assurer une bonne gestion des stocks et conserver une traçabilité
- Adapter une gestion de sécurité alimentaire basée sur l'analyse des risques points critiques ou HACCP qui pourrait améliorer la qualité des glaces et des crèmes glacées au niveau des usines de fabrication, des manufactures et des points de vente..

## Références bibliographiques

1. Agence canadienne d'inspection des aliments, (2019). *Mesures de contrôle contre la Listeria monocytogenes dans les aliments prêts-à-manger*. Santé Canada. Rapport : 19p.
2. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire Alimentation, Environnement et Travail, (2011). *Caractéristiques et sources de Listeria monocytogenes*. CNR-CCOMS des Listeria, Institut Pasteur, Paris. 4p.
3. Alvarez, V. B. (2009). *Ice cream and related products*, in: S. Clark, M, Costello, MA, Drake, M.A. (Ed.), *The Sensory Evaluation of Dairy Products*. Floyd Bodyfelt. 331.
4. Aouissi, A., Fouzari. A. et Meziane, N. (2007). *Qualité bactériologique de l'eau d'Oued Seybouse*. Mémoire d'ingénieur. Université 8 Mai 1945 Guelma. 57p.
5. Avril, J.L., Fauchère, J.L. (2007). *Cours de bactériologie DCEM1*, Faculté de médecine de Nantes. 36p.
6. Badri, N. et Necib, T. (2016). *Étude de la sensibilité aux antibiotiques des souches des entérobactéries isolée de fromage frais artisanale "Jben"*. Université de Larbi Tébessi. 62p.
7. Bashir, A., (2018). *Why you should NEVER refreeze ice cream if it's melted: Expert warns there is a very high risk food poisoning*. Mail Online.
8. Bendimerad, A., (2010). *Effet de la supplémentation en sélénium sur la réponse immunitaire au cours de l'infection à sarm*. Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen.
9. Bengati, S., Boudraa, W. et Djamaa, F., (2011). *Contribution à l'étude de la qualité bactériologique et physico-chimique de l'eau des plages de la ville d'Annaba*. Université de Guelma. 72p.
10. Bergmann, J-F., Decazes. J-M. et Schlemmer. B., (2001). *Médicaments antibiotiques : Nouveautés*. Springer Science and Business Media dans l'évaluation et l'utilisation. 118p.
11. Bettelheim, K., (2007). *The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) Escherichia coli; Under-Rated Pathogens. Critical Reviews in Microbiology* 33(1):67-87.
12. Bouaricha, N., (2007). *La crème glacée fait des émules en Algérie Immersion dans l'univers du fondant et de la fraîcheur*. Quotidien Algérien El Watan le 23 - 08 – 2007.
13. Boukrouma, N., (2008). *Contribution à l'étude de la qualité microbiologique de l'eau d'un écosystème aquatique artificiel : cas de la retenue collinaire d'Ain Fakroune (W. d'Oum El-Bouaghi)*. Mémoire de Magister. Université 8 mai 1945, Guelma. 64p.

14. Bourgeois, C.M., Leveau, J.Y., (1980). *Technique d'Analyse Et/De Contrôle Dans Les Industries Agro-Alimentaires*. 11, rue Lavoisier, 75384 Paris Cedex 08. 331p.
15. Bousseboua, H., (2003). *Cours de microbiologie générale, université Mentouri Constantine*. 28p.
16. Boutonnier, J-L., (2001). *Crèmes glacées, glaces et sorbets : formulation et fabrication*. Technique de L'Ingénieur. 10p.
17. Branger. A., (2007). *Alimentation et processus technologiques*. Educagri Editions. 293p.
18. Brisabois, A., Lafarge. V., Brouillard, A., Buyser. M.L., Collette, C., Garin-Bastuji, B. et Thorel, M.F., (1997). *Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe*. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 16 (1), 452- 471.
19. David, J., (2009). *Attribution des cas de salmonelloses humaines aux différentes filières de production animale en France*. Université Européenne de Bretagne. 259p.
20. Deberghes, P., (1995). *Contribution à l'étude de l'écologie des Enterobacteriaceae dans des Unités de Fabrication de Poudre de Lait*. Université des Sciences et Techniques de Lille. 119p.
21. Declercq, C., Vlegels, K., (2007). *Glaces : Délices et fraîcheur*. Lannoo Uitgeverij. 127p.
22. Dégremont, (1998). *Mémento technique de l'eau 8ème édition TecetDoc*. Paris 986p.
23. Delarras, C., (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire ? Recherche de bactéries et de levures-moisissures*. Lavoisier. 772p.
24. Dromigny, E., (2011). *Les critères microbiologiques des denrées alimentaires : Réglementation, agents microbiens, autocontrôle*. Lavoisier. 509p.
25. Dudez, P., François, M. et Raiffaud, C., (2017). *Transformer les produits laitiers frais à la ferme : 3e édition mise à jour*. Educagri Editions. 126p.
26. Dupin, H., (1992). *Alimentation et nutrition humaines*. Esf Editeur. 1533p.
27. EL Ouali Alami, A., Berrada, S., Maniar, S., (2013). *Qualité microbiologique des crèmes glacées commercialisées au centre du Maroc et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées*. ScienceLib Editions Mersenne : Volume 5, N ° 130402.

28. Eyquem, A., Alouf. J. et Montagnier. L., (2000). *Traité de microbiologie clinique*. Piccin éditeur.93p.
29. Flandrois, J.P., (2000). *Bactériologie médicale*. Presses universitaires de Lyon, 115p.
30. Garnier, M., (2018). *Intoxication : il ne faut jamais remettre votre glace au congélateur*. Entreprise de presse en ligne, Planet.fr SA.
31. Gret, (2002), *Transformer les produits laitiers frais à la ferme*. Educagri Editions. 237p.
32. Herro. R., (2006). *Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de Listeria monocytogenes*. Université paris-Sud XI. 139p.
33. Institut national de la recherche et sécurité INRS, (2017). *Microorganismes aérobies M-147*. Paris.
34. Journal officiel de la République Algérienne J.O.R.A ; 2017
35. Kruijer, A. C. F., (1954). *La Crème Glacée. Le Lait*. Hall archive ouvert. 13 : 500-513
36. Kruy, S. L., Soares, J. L., Ping, S. et Flye, F., (2001). *Qualité microbiologique de l'aliment "glace, crème glacée, sorbet" vendu dans les rues de la ville de Phnom Penh ; avril 1996 - avril 1997*. Sainte-Marie Institut Pasteur du Cambodge. 4p.
37. Lapointe-Vignola, C., (2002). *Science et technologie du lait : transformation du lait*, Presses inter Polytechnique. 600p.
38. Lebres, E.H.A., (2002).Manuel des Travaux pratiques. *Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments*. Unité : Microbiologie des laits et produits laitiers. Institut Pasteur d'Algérie. 31p.
39. Leminer, L., Veron, M. et Bourllioux, A., (1992). *Bacteriologie médicale*. Flammerion Médecine Science. 1107p.
40. Massa. S., Poda. G., Cesaroni. et Trovatelli, L.D., (1989). *A bacteriological survey of retail ice cream*. Food Microbiology, 6, 129-134.
41. Ndao, A., (1994). *Contribution à l'étude de la qualité hygiénique des crèmes glacées commercialisées sur le marché Dakarois*. Université Cheikh Anta Diop. 61p.
42. Ndayo-Wouafo, M., (1994). *Qualités microbiologiques des glaces et des crèmes glacées produites dans deux métropoles du Cameroun : Douala et Yaoundé*. Université des sciences et technologies de Lille. 111p.

43. NIIR Board of Consultants and Engineers, (2005). *The Complete Technology Book on Cocoa, Chocolate, Ice cream and other Milk Products*. Niir Project Consultancy Services, 624p.
44. Organisation Mondiale de la Santé OMS, (2005). *Standardisation de l'Antibiogramme en Médecine Humaine à l'échelle nationale*. 4<sup>ème</sup> édition. 94p.
45. Organisation Mondiale de la Santé OMS, (2019). *Sécurité sanitaire des aliments : domaines d'activité*.
46. Ouïam, E. A., (2014). *Profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de staphylococcus aureus isolées au centre hospitalier Ibn Sina de Rabat*. Université Mohammed V - Souissi Rabat. 95p.
47. Pebret, F., (2003). *Maladies infectieuses : toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales*. Heures de France. 592p.
48. Philippon, A., (2001). *Cours en ligne de bactériologie médicale, les Entérobactéries*. Université Paris V.
49. Rapport de la commission Listeria de l'AFSSA, (2000). *Etude des risques liés à Listeria monocytogenes*. 143p.
50. Rapport du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, (2016). *Recherche et dénombrement de Staphylococcus aureus : méthode par filtration sur membrane*. 18p.
51. Rapport de l'Institut de l'élevage, (2009). *Traite des vaches laitières : Matériel, installation, entretien*. France Agricole Éditions. 555p.
52. Silue, N., (2005). *Thermorésistance de trois sérotypes de salmonella dans l'œuf et les gésiers de poulets*. Université Cocody d'Abidjan.
53. Somogyi, A., (2017). *ECNi Le Tout-en-un*. Elsevier Health Sciences. 1416p.
54. Tassew, H., Abdissa, A., Beyene, G. et Gebre-Selassie. S., (2013). *Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents*. Ethiop J Health Sci. 2010 Nov; 20(3):137-43.
55. Tellier, E., (2005). *Sécurité sanitaire des aliments : Les toxi-infections alimentaires à Salmonelles*. Université de Nantes. 110p.
56. White, A. H., (1947). *La fabrication industrielle de la crème à la glace*. Bulletin technique 26 révision dominion du canada. 40p.

57. Wouafo, MN., Nijine, T. et Tailiez, R., (1996). *Hygiene and microbiologic quality of ice creams produced in Cameroon. A public health problem. Bulletin De la Société de pathologie Exotique* 89(5) :358-62.
58. Yaman, H., Elmali. M., Ulukanli, Z., Tuzcu, M. et Genctav, K., (2006). *Microbial quality of ice cream sold openly by retail outlets in Turkey. Revue Med Vet* 157. 10 : 457-462.

### Sites Web:

1. [http://www.apaqw.be/Productions/Les-autres-produits-laitiers/La-glace/Les-types-de-glace.aspx?fbclid=IwAR0nKT\\_LCQCVXoJETMvOW6TBSV6fNwJS3C-TUdAImbHNS1laCV1TM53\\_IBQ](http://www.apaqw.be/Productions/Les-autres-produits-laitiers/La-glace/Les-types-de-glace.aspx?fbclid=IwAR0nKT_LCQCVXoJETMvOW6TBSV6fNwJS3C-TUdAImbHNS1laCV1TM53_IBQ) (Consulté le 17/04/2019).
2. <https://www.plaisirslaitiers.ca/la-creme-glacee/l-histoire-de-la-creme-glacee?fbclid=IwAR2BPPYYUR0pcJloMS4ChWWGiYo4zeKSDk6PKyX5hVVv3eOYalceydW0xsY> (Consulté le 19/04/2019).
3. <http://www.sia-agro.fr/etude-creme-glacee/> (Consulté le 20/04/2019).
4. <https://www.selection.ca/cuisine/nutrition/creme-glacee-sorbets-bienfaits-sante/> (Consulté le 22/04/2019).
5. <https://www.sante-sur-le-net.com/sante-quotidien/maux-quotidien/intoxication-alimentaire/> (Consulté le 24/04/2019).
6. [https://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu\\_culture/CHAPMAN.htm](https://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/Milieu_culture/CHAPMAN.htm) (Consulté le 06/03/2019)
7. [http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests\\_microbiologie2.htm](http://www2.ac-lyon.fr/enseigne/biotech/microbio/tests_microbiologie2.htm) (Consulté le 06/03/2019).
8. [http://www.biologiemarine.com/\\_fiches/APIpdf/api%20Staph-07468-K-fr-20500.pdf](http://www.biologiemarine.com/_fiches/APIpdf/api%20Staph-07468-K-fr-20500.pdf) (Consulté le 07/03/2019).
9. [http://www.techmicrobio.eu/documentation\\_fabricants/Biomerieux%20et%20API/Staphylococcus/API%20Staph.pdf](http://www.techmicrobio.eu/documentation_fabricants/Biomerieux%20et%20API/Staphylococcus/API%20Staph.pdf) (Consulté le 07/03/2019).
10. <http://anne.decoaster.free.fr/btelechar/bpoly/enteroba05.pdf> (Consulté le 05/03/2019).
11. <http://www.efsa.europa.eu/fr/press/news/120314.htm> (Consulté le 15/04/2019).

# Résumé

**Résumé :**

Notre étude dont l'objectif est la détection, l'isolement, l'identification et l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries contenues dans les crèmes glacées a été réalisée sur onze prélèvements provenant de onze crèmeries différents exerçant de la ville de Guelma. Les résultats que nous avons obtenus montrent la présence d'un grand nombre de bactéries appartenant principalement aux familles des Enterobacteriaceae, des Micrococcaceae et des Pseudomonaceae. Les principales sont : *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis* et *Staphylococcus epidermidis*. Ces derniers témoignent du manque d'hygiène pendant tout le processus de fabrication et de manipulation de ce produit très sensible. La totalité des souches isolées sont résistantes à l'Ampicilline et la plus part sont sensible au Chloramphénicol.

**Mots clés :** Crèmes glacées, analyse microbiologique, toxi-infection, qualité hygiénique, Guelma

**Summary:**

The current study aims to detect, isolate, identify and assess the sensitivity to antibiotics of bacteria isolated from samples collected from eleven creameries randomly selected in Guelma City.

The obtained results showed the presence of a large number of bacteria mainly belonging to Enterobacteriaceae, Micrococcaceae and Pseudomonaceae families, namely, *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus capitis*. The present study highlights the problem of negligence and lack of hygiene throughout the process of manufacturing and handling this very sensitive product. All of the strains were resistant to ampicillin and most of them were sensitive to Chloramphenicol.

**Key words:** Ice cream, microbiological analysis, toxi-infection, hygienic quality, Guelma.

## الملخص:

دراسنا هذه تهدف إلى عزل وتعريف ودراسة الحساسية للمضادات الحيوية للبكتيريا الموجودة في المتلجات انطلاقاً من احدى عشر عينة مختلفة مأخوذة من احدى عشرة محلاً للمتلجات على مستوى مدينة قالمة. النتائج المتحصل عليها تظهر وجود عدد كبير من البكتيريا التي تنتمي أساساً إلى عائلات *Enterobacteriaceae*, *Micrococcaceae* و *Pseudomonaceae* والأنواع الأساسية متمثلة في *Klebsiella pneumoniae ozaenae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Pseudomonas fluorescens/putida*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus capitis* و *Staphylococcus epidermidis*. وجود هذه الأنواع يدل على نقص شروط النظافة خلال مراحل إنتاج هذه المادة الغذائية الحساسة جداً للملوثات. معظم السلالات المعزولة مقاومة للأمبيسيلين وحساسة للكلورامفينيكول.

**الكلمات المفتاحية:** المتلجات، التحليل الميكروبيولوجي، العدوى بالسوم، الجودة الصحية، قالمة.

**Les milieux de cultures :****Milieu de Chapman :**

Composition :

Peptone tryptique de caséine.....	10 g
Extrait de viande.....	01 g
Chlorure de sodium.....	75 g
Mannitol.....	10 g
Rouge de phénol.....	0.025 g
Agar.....	15 g
Eau distillé.....	1000 ml

Préparation : Après dissolution tous les ingrédients dans l'eau distillée ajuster le PH à 7.5 et stériliser à 121°C pendant 20 mn.

**Gélose nutritive :**

Composition :

Extrait de viande de l'œuf.....	01 g
Agar.....	15 g
Peptone.....	05 g
Chlorure de sodium.....	15 g
Extrait de levure.....	02 g

Préparation : Verser 28 g dans un litre d'eau distillée. Ajuster le PH à 7.4. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

**Gélose Hektoen :**

Composition :

Protaesepeptone.....	02 g
Extrait de levure.....	03 g
Chlorure de sodium.....	05 g
Thiosulfate de sodium.....	05 g
Sels biliaires.....	09 g

Citrate de ferammoniacale.....	1.5 g
Salicine.....	02 g
Saccharose.....	12 g
Lactose.....	02 g
Fuchsine acide.....	0.1 g
Bleu de brothynol.....	0.06 g
Agar.....	1.4 g
Eau distillée.....	1000 ml

PH =7.5

### Gélose SS :

Composition :

Peptone.....	05 g
Extrait de viande.....	05 g
Lactose.....	10 g
Citrate de sodium.....	10 g
Citrate de fer III.....	01 g
Sels biliaires.....	8,5 g
Vert brillant.....	3,3 mg
Rouge neutre.....	25 mg
Thiosulfate de sodium.....	08.5 g
Agar.....	12 g

PH= 7,3

Préparation : 63g de poudre dissous par ébullition. Se reporté à la notice en raison de variation de la composition. (Ne pas autoclave).

**Milieu TSI :**

Agar.....	12 g/l
Extrait de l'œuf.....	03 g/l
Extrait de levure.....	03 g/l
Peptone.....	20 g/l
Lactose.....	10 g/l
Saccharose.....	10 g/l
NaCl.....	05 g/l
Glucose.....	01 g/l
Citrate ferrique.....	03 g/l
Thiosulfate de sodium.....	03 g/l
Rouge de phénol.....	0,025 g/l
Eau distillée.....	1000 ml

Ajuster le pH à 7.4

**Gélose au sang :**

Composition :

Mélange spécial de peptones.....	23 g /l
Amidon.....	1 g/l
NaCl.....	5g/l
Agar.....	10 g/l
Sang de mouton.....	50 mL

PH final = 7,3

**Réactifs :**

**Réactif TDA :** pour la recherche de tryptophane désaminase :

Perchlorure de fer.....	3.4 g
Eau distillée.....	100 ml

**Réactif IND** : pour la recherche de l'indole :

Paradiméthylamino benzaldéhyde.....	5.0 g
Alcool isoamylique.....	75 ml
HCL.....	37 %

**Réactif Kowacks** : pour la recherche de l'indole

Paradeéthylamino benzaldéhyde.....	05 g
Alcool amylique.....	75 ml
HCl pur.....	25 ml

**Rouge de méthyle** :

Rouge de méthyle.....	0,5 g
Alcool éthylique à 60°.....	100 ml

**Colorants** :

**Lugol** : Elle est utilisée sur la coloration de Gram pour fixer le colorant.

Iode.....	01 g
Iodure de potassium.....	02 g
Eau distillée.....	03 g

**Violet de gentiane** : Elle est utilisée pour colorer les bactéries.

Violet de gentiane.....	01 g
Ethanol à 90%.....	01 ml
Phénol.....	02 g
Eau distillée.....	100 ml

## Les galeries API utilisées :

Lecture de la galerie miniaturisée API 20<sup>E</sup> in (Lightfoot et Maier, 1998).

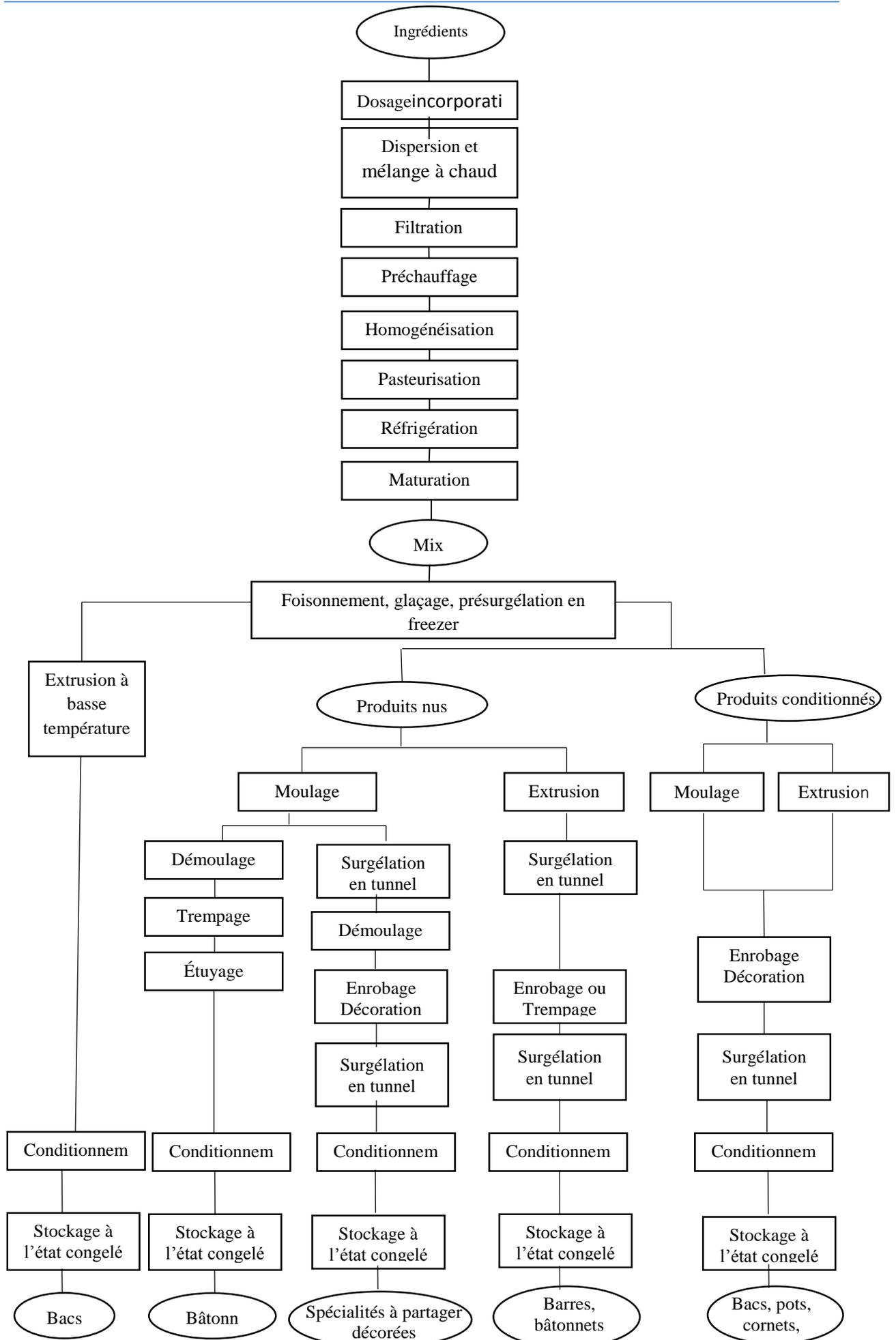
Tests	Substrat	Caractère recherché	Résultats	
			Négatif	Positif
<b>ONPG</b>	Ortho-nitro-phenylgalactoside	Beta-galactosidase	incolore	jaune
<b>ADH</b>	Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge/orangé
<b>LDC</b>	Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Orangé
<b>ODC</b>	Ornithine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge/orangé
<b>CIT</b>	Citrate de sodium	Utilisation du citrate	Vert pâle/jaune	Bleu-vert/vert
<b>H2S</b>	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Incolore/grisâtre	Dépôt noir/ fin liseré
<b>URE</b>	Urée	Uréase	Jaune	Rouge/orangé
<b>TDA</b>	Tryptophane	Tryptophane désaminase	<b>TDA / Immédiat</b>	
			Jaune	Marron foncé
<b>IND</b>	Tryptophane	Production d'indole	<b>IND / 2 mn, maxi</b>	
			Jaune	Anneau rouge
<b>VP</b>	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	<b>VP 1 + VP 2 / 10 mn</b>	
			incolore	Rosé-rouge
<b>GEL</b>	Gélatine de Kohn	Gélatinase	Non diffusion	Diffusion du pigment noir
<b>GLU</b>	Glucose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MAN</b>	Mannitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>INO</b>	Inositol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SOR</b>	Sorbitol	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>RHA</b>	Rhamnose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>SAC</b>	Saccharose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>MEL</b>	Melibiose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>AMY</b>	Amygdaline	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune

<b>ARA</b>	Arabinose	Fermentation/oxydation	Bleu/bleu-vert	Jaune
<b>Ox</b>	Sur papier filtre	Cytochrome-oxydase	<b>Ox / 5-10 mn</b>	
			incolore	Anneau violet
<b>NO3-NO2</b>	Tube GLU	Production de NO2 Réduction au stade N2	<b>NIT 1 + NIT 2 / 2-3 mn</b>	
			Jaune	Rouge
			<b>Zn</b>	
			Rouge	Jaune
<b>MOB</b>	Microscope	Mobilité	Immobile	Mobile
<b>MAC</b>	Milieu de MacConkey	Culture sur	Absence	Présence
<b>OF</b>	Glucose	Fermentation : sous huile Oxydation : à l'air	Vert	Jaune
			Vert	Jaune
<b>CAT</b>		Possession d'une catalase	<b>H2O2 / 1-2 mn</b>	
			Pas de bulles	Bulles

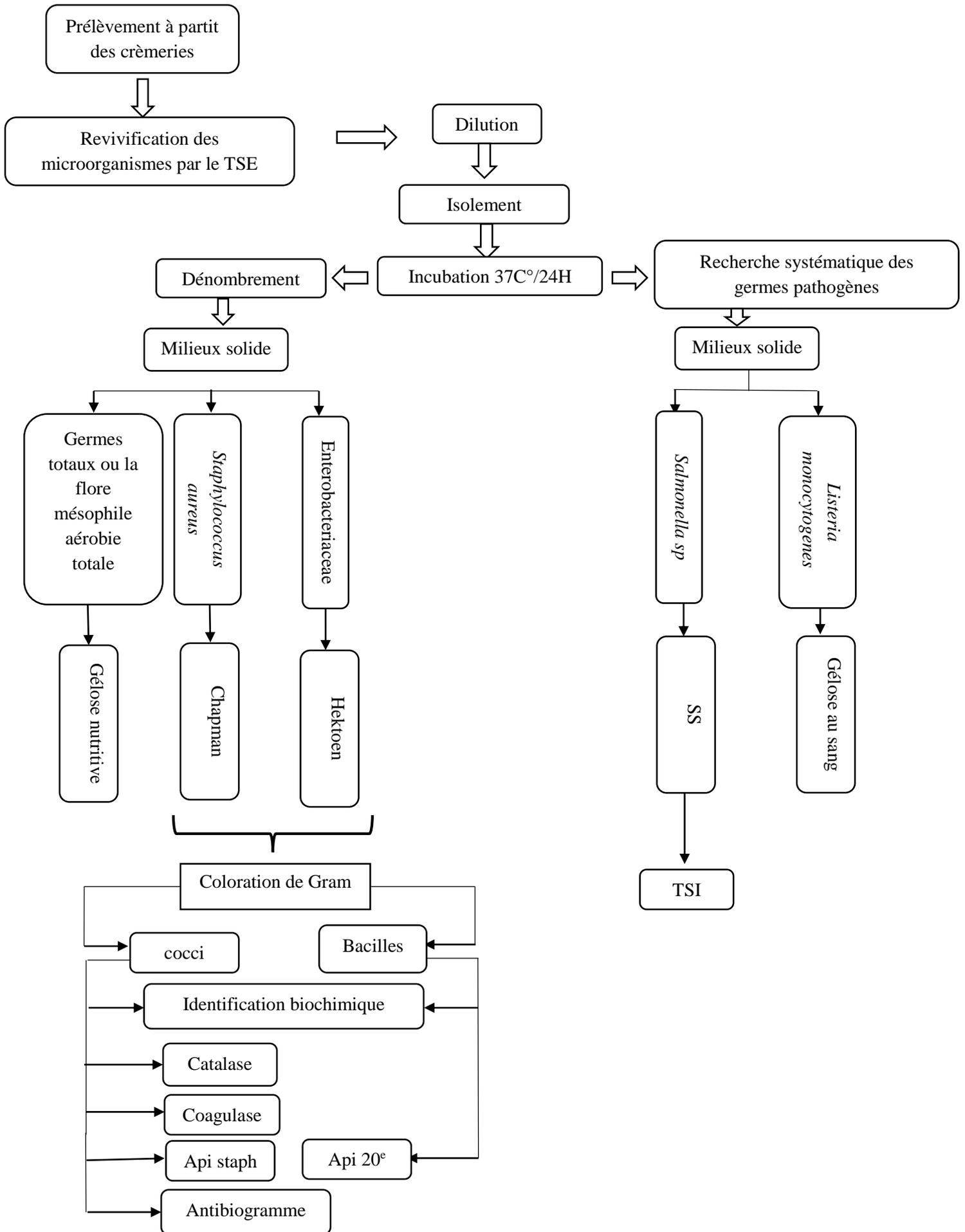
## API staph :

Tableau de lecture

TESTS	COMPOSANTS ACTIFS	QTE (mg/cup)	REACTIONS / ENZYMES	RESULTAT	
				NEGATIF	POSITIF
<b>0</b>	Aucun		Témoin négatif	rouge	—
<b>GLU</b>	D-glucose	1,56	(Témoin positif)	rouge *	jaune
<b>FRU</b>	D-fructose	1,4	(D-GLUcose) acidification		
<b>MNE</b>	D-mannose	1,4	(D-FRUctose) acidification (D-		
<b>MAL</b>	D-maltose	1,4	ManNosE)		
<b>LAC</b>	D-lactose (origine bovine)	1,4	acidification(MALtose)		
<b>TRE</b>	D-tréhalose	1,32	acidification(LACtose)		
<b>MAN</b>	D-mannitol xylitol	1,36	acidification		
<b>XLT</b>	D-mannitol xylitol	1,4	(D-TREhalose) acidification		
<b>MEL</b>	D-mélibiose	1,32	(D-MANnitol) acidification (XyLiTol)acidification (D-MELibiose)		
<b>NIT</b>	nitrate de potassium	0,08	Réduction des NITrates en nitrites		
<b>PAL</b>	$\beta$ -naphtyl phosphate	0,0244	Phosphatase ALcaline	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> jaune   violet	
<b>VP</b>	sodium pyruvate	1,904	production d'acétyl méthyl-carbinol (Voges Proskauer)	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> incolor-rose pâle   violet-rose	
<b>RAF</b>	D-raffinose	1,56	acidification (RAFfinose)	rouge	jaune
<b>XYL</b>	D-xylose	1,4	acidification (XYLose)		
<b>SAC</b>	D-saccharose	1,32	acidification (SACcharose)		
<b>MDG</b>	méthyl-D-glucopyranoside	1,28	acidification (Méthyl-D- Glucopyranoside)		
<b>NAG</b>	N-acétyl-glucosamine	1,28	acidification (N-Acétyl-Glucosamine)		
<b>ADH</b>	L-arginine	1,904	Arginine DiHydrolase	jaune	orange-rouge
<b>URE</b>	urée	0,76	UREase	jaune	rouge-violet



**Figure 1** : Procédés types de fabrication des glaces



**Figure 2** : protocole de la recherche des bactéries des crèmes glacées