

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mentouri de Constantine

*Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-
Alimentaires
(INATAA)*

Département de : Biotechnologie Alimentaire

N° d'ordre :

N° de série :

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du :

Diplôme de Magistère en : *Sciences Alimentaires*
Option : *Biotechnologie Alimentaire*

**Caractérisation et contrôle de la qualité de
ferments lactiques utilisés dans l'industrie
laitière algérienne**

Présenté par : M^{elle}LEKSIR Choubaila

Le : 06 Décembre 2012

Devant le jury composé de :

Président : Dr. BEKHOUCHE F. (MCA, INATAA, UMC)

Rapporteur : Dr. BOUSHABA R. (MCA, INATAA, UMC)

Examineurs : Dr. KHARROUB K. (MCA, INATAA, UMC)

Dr. HAMIDECHI M. A. H. (MCA, UMC)

Année universitaire 2012-2013

Remerciements

Nous tenons à remercier les institutions ayant soutenu notre travail :

Institution
SARL Hodna
lait



Adresse et coordonnées
Zone Industrielle M'sila 28000
M'sila - Algérie
BP : 451, CA

Téléphone:
(+213) (0) 35 54 77 77
Service consommateur
(+213) (0) 35 55 66 53
Fax:
(+213) (0) 35 54 98 87
Email :
contact@hodna-lait.com
Web :
<http://hodna-lait.com/>

Contacts
M. CHAOUI Ridha
(+213) (0) 35 54 50 14

Fonction
Directeur qualité

SARL Safilait



11 rue Sedira, Ain-Smara
Constantine 25140 Algérie

Téléphone:
(+213) (0) 31 97 39 39
Fax:
(+213) (0) 31 97 16 08

Email:
safilait@safilait.com

Web:
<http://www.safilait.com/>

M. HANNACHI Nasr-
Eddine
M. BOUCHACHIA Smail
M. CHERCHARI
Abdesselam
M. SAHRAOUI Djamel

Directeur du contrôle et
assurance qualité
Responsable de collecte
Directeur technique de la
laiterie
Responsable
d'approvisionnement

SNC Igilait



Siege social: 07 Rue des
maquisades prolongée - Jijel
Unité de production: Tassoust –
BP 63.

Tél:
(+213) (0) 34 51 01 01
Fax:
(+213) (0) 34 51 01 04

Email:
bchiheb@yahoo.fr

M. BACHIR Chiheb

M. ZAHZOUH Fayçal
Mme. HAMAMA Halima
M. CHIHEB Nasr-Eddine

Gérant Directeur de
l'usine
Responsable laboratoire
Responsable commercial

Laiterie
Edough

Route d'El Hadjar BP 3084
Allelick El Bouni – Annaba

Téléphone:
(+213) (0) 38 52 28 09
(+213) (0) 38 52 52 32 à 34

Fax:
(+213) (0) 38 52 52 31

M. ABDELMOUMEN
Abdelrafik

Responsable production

Remerciements

Je rends grâce à **Allah**, le Clément, le tout Miséricordieux, pour la chance qu'Il m'a donnée pour poursuivre mes études supérieures, et pour le courage qu'Il m'a donné pour bien mener ce travail. Gloire à Allah.

Je commence tout d'abord, par remercier **Dr. BOUSHABA Rihab**. Je suis vraiment chanceuse de vous avoir comme promotrice, j'ai connu avec vous le vrai sens d'un encadrement de qualité, je vous remercie vivement pour toutes les heures, les jours et les mois que vous avez passés avec patience extrême à me diriger et corriger ce manuscrit. Je vous remercie pour vos conseils et encouragements et votre soutien inestimable pendant les moments délicats que j'ai vécus en une période donnée. Je vous remercie pour votre modestie mais aussi pour votre partage du savoir et large disponibilité. Veuillez trouver ici toutes mes expressions de profonde gratitude et mes sentiments de respect chère encadrante. Je vous serai reconnaissante pour le reste de ma vie.

Mes remerciements sont adressés également aux membres du Jury qui ont pris sur leur temps et ont bien voulu accepter de juger ce modeste travail :

Je tiens à exprimer ma très grande considération, et mon profond respect à **Dr. BEKHOUCHE Farida** qui m'a fait l'honneur de présider ce Jury malgré toutes ses responsabilités et ses nombreuses occupations. Je vous remercie pour votre modestie mais aussi pour votre partage du savoir, un grand merci pour tout ce que j'ai appris grâce à vous au cours de mes années de graduation et de post graduation à l'INATAA. Je vous remercie Madame pour votre soutien lors de vos passages fréquents au laboratoire de microbiologie accompagnés d'orientations et de remarques précieuses. Vous trouvez ici toutes mes expressions respectueuses et ma profonde gratitude.

Je remercie vivement **Dr KHARROUB Karima** d'avoir eu l'amabilité de bien vouloir examiner ce travail, mais aussi pour tous ses efforts avec nous tout au long de ma vie à l'INATAA. J'étais tout le temps satisfaite de votre qualité exceptionnelle de bonne enseignante. Merci de m'avoir guidée vers l'amour de la science, merci de m'avoir fait découvrir les merveilleuses créatures de Dieu ; 'les micro-organismes'. Ma vie a changé depuis ce jour, je vois le monde autrement grâce à vous. Toutes mes expressions de respect et de gratitude.

Je remercie **Dr HAMIDECHI Abdel Hafid** d'avoir accepté d'examiner ce présent travail malgré ses occupations multiples. Je vous remercie énormément de nous avoir assuré le module de bioinformatique, c'était un grand honneur d'apprendre avec vous comment marier des chiffres et des équations avec du matériel génétique pour donner naissance à une science qui m'a beaucoup passionnée. Je ne peux que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Au terme de la réalisation de ce travail, il m'est difficile d'établir la liste des personnes à remercier ...Remercier individuellement, c'est prendre un risque, le risque d'oublier, oublier les petites mains qui m'ont aidée un jour, oublier les personnes qui m'ont rendu service, oublier les personnes qui m'ont donné conseil ... Et ce risque, je ne veux pas le prendre ...

Que tous ceux qui ont été impliqués de près ou de loin dans la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude : sans votre contribution, il m'aurait été impossible de mener à bien ce projet.

Je ne peux passer sous silence la patience dont a dû faire preuve, **ma chère famille**, notamment mon cher **Papa**, ma **Frangine** unique et la personne la plus chère à mon cœur : **ma très chère Maman** qui m'a supportée vaillamment pas à pas tout au long de ma vie ...

Mama, tu es **la seule** qui comprenne ma vie : Je te demande pardon et encore une fois Merci.

Merci à tous de me permettre de tourner cette page et de me lancer dans de nouveaux défis ...

Choubeïla

***Le présent travail fut présenté dans les manifestations scientifiques
suivantes:***

Congrès international 'L'aide à l'agriculture algérienne'

Université Badji Mokhtar Annaba
Faculté des Sciences
Département de Biologie
22-24 Novembre 2011



Communication orale : « **Industrie laitière en Algérie : Enjeux et atouts** »

Troisième Colloque International 'Formation Recherche et Développement FRD : La Production et la Productivité pour une Agriculture Durable'

LECODEV Canada & Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen
12-14 décembre 2011



Communication affichée : « **Nécessité de l'application de la stratégie Recherche-Développement dans l'industrie laitière en Algérie** »

Premier séminaire national 'Lait et dérivés entre la réalité de production et réalités de transformation et de consommation'

Université 8 Mai 1945 de Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
et des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie
4-5 Octobre 2011



Communication orale : « **Évaluation du potentiel de la biotechnologie dans la caractérisation et le contrôle de qualité des ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière** »

Journées Internationales de Biotechnologie

L'Association Tunisienne de Biotechnologie
Hôtel Nour Palace, Mahdia (Tunisie)
19-22 Décembre 2012



Communication affichée : « **Les ferments lactiques : Vecteurs d'antibiorésistance et risque de transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques à la flore digestive humaine** »

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ANNEXES

INTRODUCTION	01
1. Problématique et contexte	01
2. Objectifs de l'étude	02
3. Intérêt de l'étude	02
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	03
CHAPITRE I : INDUSTRIE DE TRANSFORMATION LAITIERE	03
I.1. Généralités sur l'industrie laitière algérienne	03
I.2. Produits laitiers fermentés	05
I.2.1. Lait fermenté	06
I.2.1.1. L'ben	07
I.2.1.2. Raïb	07
I.2.2. Yaourt	07
I.2.3. Fromage	10
CHAPITRE II: LES FERMENTS LACTIQUES	14
II.1. Généralités sur les ferments lactiques	14
II.1.1. Définition	14
II.1.2. Taxonomie des microorganismes utilisés dans l'industrie laitière	15
II.1.2.1. Levures	15
II.1.2.2. Moisissures	15
II.1.2.3. Bactéries	15
II.1.3. Rôle des ferments	16
II.1.4. Types de ferments	17
II.1.4.1. Ferments artisanaux	17
II.1.4.2. Ferments commerciaux	18
2.2. Technologie de production des ferments commerciaux	20
II.2.1. Modes d'ensemencements	20
II.2.2. Diagramme général de production	22
II.2.3. Conservation et modes de commercialisation des ferments	25
II.3. Qualité et critères de sélection des ferments lactiques	26
II.3.1. Critères de sécurité	28
II.3.2. Fonctionnalités technologiques	28
II.3.3. Performances	29
II.3.4. Propriétés probiotiques	30
II.3.5. Aspects relatifs aux mélanges de souches/espèces	30
II.4. Problèmes liés à l'utilisation des ferments lactiques	31
II.5. Le génie génétique pour l'amélioration des ferments lactiques	32
II.6. Caractéristiques du marché mondial des ferments lactiques	33

CHAPITRE III : REGLEMENTATION RELATIVE AUX FERMENTS INDUSTRIELS	34
III.1. Aperçu des exigences réglementaires	34
III.1.1. Union Européenne	34
III.1.2. USA	36
III.1.3. Associations professionnelles	37
III.1.4. Algérie	37
CHAPITRE IV : RESISTANCE DES BACTERIES LACTIQUES AUX ANTIBIOTIQUES	38
IV.1. Définitions de la résistance aux antibiotiques	39
IV.2.1. Mécanismes biochimiques	40
IV.2.1.1. Interférence avec le mécanisme de transport de type imperméabilité	40
IV.2.1.2. Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux	40
IV.2.1.3. Inactivation ou détoxification enzymatique	40
IV.2.1.4. Modification d'affinité de la cible	40
IV.2.1.5. Substitution de cible	40
IV.2.2. Mécanismes génétiques	41
IV.2.2.1. Mutation	41
IV.2.2.2. Acquisition d'ADN	41
IV.3. Familles des antibiotiques	41
IV.4. Mode d'action des antibiotiques	43
IV.4.1. Synthèse de la paroi	43
IV.4.2. Réplication (synthèse de l'ADN)	43
IV.4.3. Transcription (synthèse des ARN)	43
IV.4.4. Traduction (synthèse des protéines)	43
IV.5. Problèmes liés à l'utilisation des antibiotiques	43
IV.5.1. Les problèmes sanitaires	43
(i) Problèmes d'allergie	43
(ii) Risques toxiques	44
(iii) Modifications de la flore digestive du consommateur	44
(iv) Risques d'antibiorésistance	44
IV.5.2. Les problèmes technologiques	44
IV.6. Pertinence de la résistance aux antibiotiques aux ferments lactiques	45
MATÉRIELS ET MÉTHODES	46
I) MATÉRIELS	46
I.1. Matériel biologique	46
I.2. Antibiotiques	48
I.3. Milieux de culture, appareils et réactifs	48
II) MÉTHODES	48
II.1. Contrôle de la qualité microbiologique des ferments	48
II.1.1. Réhydratation des ferments	49
II.1.2. Préparation de la dilution mère	49

II.1.3. Préparation des dilutions décimales	49
II.1.4. Recherche et dénombrement des germes de contamination	50
II.1.4.1. Coliformes	50
II.1.4.2. Streptocoques fécaux	51
II.1.4.3. Salmonelles	52
II.1.4.4. Levures et Moisissures	52
II.1.4.5. Staphylocoques à catalase positive	53
II.1.4.6. Bactéries non lactiques	53
II.2. Caractérisation des ferments commerciaux	53
II.2.1. Revivification	53
II.2.2. Isolement et purification sur milieux solides	53
II.2.3. Préservation des échantillons à basse température	54
II.2.3.1. Par réfrigération	54
II.2.3.2. Par congélation	54
II.2.4. Détermination de la morphologie	54
II.2.5. Détermination des caractères physiologiques	54
II.2.5.1. Production de catalase	55
II.2.5.2. Test de croissance dans les conditions hostiles	55
II.2.5.3. Test de croissance à différentes températures	55
II.2.6. Tests d'identification biochimique	55
II.2.6.1. Test de connaissance du type fermentaire	55
II.2.6.2. Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)	56
II.2.6.3. Test Mannitol-Mobilité	56
II.2.6.4. Production d'indole	56
II.2.6.5. Fermentation des sucres	56
II.3. Analyse de la susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques	57
II.3.1. Méthode de sélection des antibiotiques testés	57
II.3.2. Détermination des concentrations des antibiotiques à utiliser	57
II.3.3. Description des tests réalisés	58
II.3.2.1. Suivi du pH (profil d'acidification)	59
II.3.2.2. Suivi de la cinétique de fermentation	59
II.3.4. Dénombrement des populations bactériennes au terme de la fermentation	59
II.4. Étude Delphi des perspectives de développement de ferments lactiques autochtones	60
II.4.1. Méthode Delphi	61
II.4.2. Approche de sélection des répondants	61
II.4.3. Description des questionnaires	62
II.4.3.1. Questionnaire destiné aux unités de production	62
II.4.3.2. Questionnaire destiné aux chercheurs/experts dans le domaine des bactéries lactiques	62
II.4.4. Administration du questionnaire et recueil de données	62
II.4.4. Administration du questionnaire et recueil de données	63
RÉSULTATS & DISCUSSION	64
I) RÉSULTATS	64
I.1. Contrôle de la qualité microbiologique des ferments lactiques	64
I.1.1. Recherche et dénombrement des Coliformes	64

I.1.2. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	64
I.1.3. Recherche des Salmonelles	65
I.1.4. Recherche et dénombrement des levures et moisissures	65
I.1.5. Recherche et dénombrement de la FTAM	65
I.1.6. Recherche et dénombrement des Staphylocoques	65
I.2. Caractérisation des ferments commerciaux	66
I.2.1. Caractères morphologiques	66
I.2.3. Caractères physiologiques	70
I.2.4. Caractères biochimiques	71
I.3. Évaluation de la susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques	73
I.3.1. Performance des ferments en l'absence des antibiotiques	73
I.3.1.1. Cinétique d'acidification	73
I.3.1.2. Cinétique de croissance cellulaire	74
I.3.2. Performance des ferments en présence des antibiotiques	75
I.3.2.1. Effet des antibiotiques sur la cinétique d'acidification	75
I.3.2.2. Effet des antibiotiques sur la croissance cellulaire	76
I.5. Contexte actuel de l'industrie de transformation laitière : une enquête Delphi	87
I.5.1. Description des répondants	87
I.5.2. Résultats de l'enquête Delphi	88
I.5.2.1. Etat des lieux de l'industrie laitière algérienne	89
I.5.2.2. Contraintes et perspectives pour le développement de ferments lactiques	92
I.5.2.3. Opinions sur les ferments lactiques génétiquement modifiés	94
II) DISCUSSION	95
II.1. Principaux constats	95
II.2. Limitations de l'étude	105
CONCLUSIONS & PERSPECTIVES	108
1. Conclusions	108
2. Perspectives	109
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	110
ANNEXES	

Noms de genres bactériens :

Lb. : *Lactobacillus*
Lc. : *Lactococcus*
Ln. : *Leuconostoc*
Sc./St. : *Streptococcus*

Milieux de culture :

BCP : Pourpre de bromocrésol
BLVBL: Bouillon lactosé bilié au vert brillant
Gélose OGA : Gélose glucosée à l'oxytétracycline
Gélose SS : Gélose *Salmonella Shigella*
MRS : Man, Rogosa & Sharpe
PCA : Plate Count Agar
TSI : Triple sugar iron

Unités de mesures :

°C : degré Celsius
g/l : gramme par litre
Log : logarithme décimal
µl : microlitre
ml : millilitre
nm : nanomètre
% : pourcentage

Acronymes :

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ATB: Antibiotique
ATP : Adénosine triphosphate
BPL: Licence de bonnes pratiques de fabrication
BNR : Bas niveau de résistance
c.-à-d. : c'est à dire
CE : Communauté européenne
CMI : concentration minimale inhibitrice
CRISPR : *clustered, regularly interspaced short palindromic repeats*
CVMP: *The Committee for Medicinal Products for Veterinary Use*
DANMAP : *Danish Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme*
DM: Dilution mère
D.O. : Densité optique
DSC : *Defined (multi) strain cultures*
DVI : *Direct vat inoculation cultures*
DVS : *Direct vat set*
EFFCA : *European food and feed cultures association*

EPS : Exopolysaccharides
FDA : *Food and drug administration*
FIL : Fédération internationale laitière
FINRES : *Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents report*
FTAM : Flore totale aérobie mésophile
GMP : *Good manufacturing practices*
GRAS : *Generally Recognized as Safe*
GRS : Généralement reconnu comme (étant) sûrs
HNR : Haut niveau de résistance
IAA : Industrie Agro-Alimentaire
IDF : *International Dairy Federation*
INATAA : Institut de la nutrition, de l'alimentation et des technologies agro-alimentaires
INRA : Institut national de la recherche agronomique
JORA : Journal officiel de la république algérienne
Ltd : *Limited company*
MARAN : *Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands*
MSS : *Mixed-strain starter*
NMC : *Natural milk cultures*
NORM/NORM-VET : *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*
NPP : Nombre le plus probable
NSLAB : *Non-starter lactic acid bacteria*
NWC : *Natural whey cultures*
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
OMS : Organisation mondiale de la santé
ONS : Office national des statistiques
PCR : *Polymerase chain reaction*
PBP : *Penicillin Binding Protein*
PLP : Protéines de Liaison aux Pénicillines
QPS : *Qualified Presumption of Safety*
SCAN : *Scientific committee on animal nutrition*
SEMEP : Service d'épidémiologie et de médecine préventive
SARL : Société à responsabilité limitée
SNC : Société en nom collectif
ssp. : Sous espèce
SVARM : *Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance monitoring*
TESSy : *The european surveillance system*
UFC : Unités formant colonies
UHT : Ultra haute température
UK : *United Kingdom*
UV: Ultra-violet

LISTE DES FIGURES

Figure N°:	Page:
Figure 1. <i>Schéma général de la filière lait</i> (Chisti, 2004)	5
Figure 2. <i>Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés</i> (Béal et Sodini, 2012)	9
Figure 3. <i>Diagramme simplifié de la production du yaourt</i> (Yildiz, 2010)	10
Figure 4. <i>Étapes essentielles de transformation du lait en fromage</i> (Parente et Cogan, 2004)	11
Figure 5. <i>Modes d'ensemencement traditionnel et direct : principales étapes de mise en œuvre par le producteur de ferments et par l'utilisateur</i> (Corrieu et Luquet, 2008)	21
Figure 6. <i>Diagramme de production de ferments lactiques concentrés congelés ou lyophilisés</i> (Corrieu et Luquet, 2008)	24
Figure 7. <i>Types de ferments utilisés dans la fabrication des produits laitiers fermentés et les étapes de culture dans le procédé industriel de fermentation</i> (Salminen et al., 2004)	25
Figure 8. <i>Evolution de la résistance de E. coli aux Fluoroquinolones dans différents pays européens.</i>	38
Figure 9. <i>Principaux mécanismes de résistance intrinsèque et acquise aux antibiotiques</i> (EFSA, 2008)	41
Figure 10. <i>Méthode utilisée pour tester la susceptibilité des ferments lactiques aux différents antibiotiques testés</i>	58
Figure 11. <i>Aspects macroscopiques des colonies de différentes souches isolées à partir des ferments Lyofast Y 456 B, YC-180 Yo-Flex®, CHN-11, SALSA 1 et ALPHA 10</i>	67
Figure 12. <i>Aspects microscopiques (coloration de Gram et observation à grossissement x100) des colonies de différentes souches isolées à partir des mélanges non caractérisés représentant les ferments Lyofast Y 456 B, YC-180 Yo-Flex®, CHN-11, SALSA 1 et ALPHA 10</i>	69
Figure 13. <i>Test catalase pour la souche LX</i>	70
Figure 14. <i>Profil d'acidification des différents ferments étudiés en l'absence des antibiotiques</i>	74
Figure 15. <i>Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques dans des échantillons de laits inoculés à raison de 2% en l'absence des antibiotiques</i>	74
Figure 16. <i>Cinétique d'acidification des ferments lactiques du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) en présence de concentrations croissantes des</i>	79

antibiotiques : (a) Pen&Strep, (b) Sulfaprime S et (c) Ampicilline

Figure 17. <i>Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques : (a) Pen&Strep, (b) Sulfaprime S et (c) Ampicilline</i>	82
Figure 18. <i>Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques utilisés pour la fabrication fromagère (ALPHA 10 et CHN-11) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques : (a) Pen&Strep, (b) Sulfaprime S et (c) Ampicilline</i>	85
Figure 19. <i>Effet de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline sur la croissance cellulaire des ferments lactiques au terme de la fermentation (5,5 heures) pour les deux catégories de ferments analysés : (a) ferments du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) et (b) ferments du fromage (ALPHA 10 et CHN-11)</i>	86
Figure 20. <i>Composition des experts ayant répondu à l'enquête Delphi</i>	87
Figure 21. <i>Distribution des opérateurs industriels selon leurs fonctions</i>	88
Figure 22. <i>Carte heuristique représentant les résultats de l'enquête réalisée auprès des : (a) opérateurs industriels et (b) chercheurs algériens dans le domaine des bactéries lactiques. Ces idées représentent les opinions des experts enquêtés par rapport au contexte actuel de l'industrie laitière nationale</i>	91
Figure 23. <i>Carte heuristique représentant les opinions des chercheurs concernant : (a) les risques associés aux ferments lactiques importés et (b) les contraintes faisant face au développement de ferments lactiques autochtones</i>	93
Figure 24. <i>Profil d'acidification de lait inoculé par le ferment Lyofast Y 330 A à l'échelle industrielle</i>	96
Figure 25. <i>Profil d'acidification du ferment CHN-11 à l'échelle industrielle</i>	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°:	Page:
Tableau 1. <i>Évolution de la consommation du lait et dérivés selon l'ONS (Kaci et Sassi, 2007)</i>	4
Tableau 2. <i>Exemples de produits laitiers fermentés et leurs pays d'origine (INRA, 2009)</i>	6
Tableau 3. <i>Composition recommandée et optionnelle des ferments du yaourt (Hui, 1992)</i>	8
Tableau 4. <i>Classification des différents types de fromages et microorganismes utilisés dans leur fabrication</i>	12
Tableau 5. <i>Cultures starters des fromages (Hui, 1992)</i>	13
Tableau 6. <i>Classification des ferments utilisés dans l'industrie laitière (Ray et Bhljnia, 2008; Robinson, 2002)</i>	15
Tableau 7. <i>Cultures starters et microorganismes associés et leurs applications en industrie laitière (Hui, 1992)</i>	16
Tableau 8. <i>Coûts liés aux modes d'ensemencement traditionnel et direct (moderne)</i>	22
Tableau 9. <i>Exemples de critères de choix des ferments utilisés dans l'industrie laitière (Branger, 2007)</i>	27
Tableau 10. <i>Spécifications microbiologiques des ferments lactiques (Corrieu et Luquet, 2008)</i>	28
Tableau 11. <i>Principaux producteurs industriels européens de ferments lactiques et probiotiques (Corrieu et Luquet, 2008)</i>	33
Tableau 12. <i>Règlements européens relatifs à l'utilisation de ferments lactiques (Corrieu et Luquet, 2005)</i>	35
Tableau 13. <i>Différents types de résistance des bactéries aux antibiotiques</i>	39
Tableau 14. <i>Principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité (Abidi, 2004)</i>	42
Tableau 15. <i>Description des ferments lactiques lyophilisés étudiés</i>	47
Tableau 16. <i>Aperçu général des paramètres étudiés et les méthodes adoptées</i>	48
Tableau 17. <i>Milieux sélectifs et conditions d'incubation pour recherche des germes de contamination dans les ferments lactiques lyophilisés</i>	50
Tableau 18. <i>Conditions expérimentales pour le dénombrement de la flore lactique à différents intervalles de temps au cours de l'acidification du lait par les ferments du yaourt</i>	60
Tableau 19. <i>Dénombrement des Streptocoques fécaux sur milieu Rothe liquide par méthode NPP dans les différents types de ferments étudiés</i>	64

Tableau 20. <i>Dénombrement de la FTAM dans les différents échantillons de ferments analysés</i>	65
Tableau 21. <i>Moyennes des germes isolés et dénombrés dans les différents ferments étudiés</i>	65
Tableau 22. <i>Caractères culturels des colonies des différentes souches isolées et purifiées à partir des ferments lactiques analysés</i>	66
Tableau 23. <i>Description de l'aspect microscopique des différentes souches lactiques purifiées</i>	70
Tableau 24. <i>Récapitulatif des caractères physiologiques des souches isolées et purifiées à partir des ferments lactiques analysés</i>	71
Tableau 25. <i>Profils de fermentation des sucres par les souches lactiques isolées et purifiées à partir des mix non caractérisés</i>	72
Tableau 26. <i>Bilan des souches de bactéries lactiques isolées et identifiées</i>	73
Tableau 27. <i>Principaux aspects abordés par les chercheurs algériens dans le domaine des bactéries lactiques</i>	88
Tableau 28. <i>Opinions des chercheurs enquêtés sur les ferments lactiques génétiquement modifiés</i>	94
Tableau 29. <i>Exigences réglementaires internationales en matière de qualité microbiologique des ferments lactiques</i>	95
Tableau 30. <i>Effet des différentes doses d'antibiotiques testés sur la production de l'acide lactique par les ferments lactiques du yaourt</i>	100
Tableau 31. <i>Susceptibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques (d'Aimmo et al., 2007)</i>	101
Tableau 32. <i>Définition des CMI des différents antibiotiques vis-à-vis les ferments lactiques testés au bout 5,5 heures de fermentation</i>	101
Tableau 33. <i>Benchmarking du marché algérien du lait et dérivés par rapport à la Tunisie (Kaci et Sassi, 2007)</i>	104
Tableau 34. <i>Convergences et divergences d'opinions des experts enquêtés sur le contexte actuel de l'industrie laitière nationale</i>	104

LISTE DES ANNEXES

Annexe N° :	Page :
Annexe 1. <i>Échantillons des ferments lactiques analysés</i>	i
Annexe 2. <i>Composition des principaux milieux de culture</i>	v
Annexe 3. <i>Appareils et matériels de paillasse</i>	v
Annexe 4. <i>Réactifs chimiques et autres produits</i>	vi
Annexe 5. <i>Tableau NPP de MAC GRADY</i>	vii
Annexe 6. <i>Questionnaires</i>	viii
Annexe 7. <i>Résultats bruts des tests de susceptibilité aux antibiotiques</i>	xiv
Annexe 8. <i>Taxonomie des espèces étudiées</i>	xviii
Annexe 9. <i>Localisation et identification des entreprises ayant participé à l'enquête Delphi</i>	xv

Introduction

PROBLEMATIQUE

L'Algérie, étant un pays fortement dépendant des importations alimentaires, est particulièrement vulnérable aux risques liés aux microorganismes destinés à la consommation humaine, notamment les ferments lactiques. Parmi ces risques, l'émergence de la résistance aux antibiotiques, notamment dans la flore pathogène, ne cesse de susciter un intérêt croissant dans la communauté scientifique. Cependant, ce risque pourrait s'avérer plus important dans la flore considérée bénigne puisque les éléments génétiques responsables de résistance aux antibiotiques, en particulier ceux contenant des éléments mobiles, peuvent se déplacer rapidement chez les populations humaines et animales. Le cas des bactéries lactiques est particulièrement intéressant en raison de leur statut GRAS (généralement reconnu comme (étant) sûrs). En effet, les germes pathogènes multi-résistants aux antibiotiques peuvent transporter leurs résistance aux germes commensaux du tube digestif humain par transfert horizontal (EFSA, 2008). En outre, les micro-organismes présents en grand nombre dans une denrée alimentaire ou dans l'intestin de l'homme présentent une plus grande probabilité de transfert de gènes d'antibiorésistance en comparaison aux micro-organismes présents en plus petit nombre. C'est le cas des bactéries qui constituent les ferments lactiques et qui se développent en grand nombre pendant la fermentation des produits laitiers fermentés. De surcroît, les conditions sublétales dans lesquelles subsistent les bactéries des ferments lactiques dans le tractus intestinal humain augmentent les chances de transmission horizontale via la conjugaison de plasmides portant des gènes d'antibiorésistance par rapport à la fréquence observée entre cellules bactériennes non stressées (AFSCA, 2012).

Plusieurs études soutiennent l'hypothèse d'un lien entre l'utilisation des antibiotiques dans la production alimentaire primaire et la présence d'antibiorésistance chez des agents pathogènes humains, avec l'alimentation comme moyen de transmission important (Carattoli, 2008; Silbergeld *et al.*, 2008; Srinivasan *et al.*, 2008; Stine *et al.*, 2007; Mayrhofer *et al.*, 2006). Cependant, le risque de transfert de cette résistance par le biais des bactéries lactiques, longtemps considérées comme étant bénéfiques pour la santé, n'est pas encore bien déterminé. L'apparition de cette résistance peut être liée à des mauvaises pratiques thérapeutiques (posologie inadaptée, fréquence d'administration, non-respect de la prescription...*etc.*) (Maghuin-Rogister *et al.*, 2001) ou à l'utilisation des antibiotiques comme facteurs de croissance (sous forme d'additifs alimentaires), favorisant ainsi le développement rapide du phénomène de la résistance bactérienne aux antibiotiques (Châtaigner et Stevens, 2005). D'un autre côté, la robustesse des ferments lactiques vis-à-vis les fluctuations des paramètres opérationnels des procédés industriels constitue un critère de qualité technologique qui est prisé par les opérateurs industriels. De ce fait, les souches les plus performantes sous les conditions industrielles hostiles, entres autres la présence de résidus d'antibiotiques, auront tendance à être sélectionnées dans les opérations de criblage des souches industrielles.

OBJECTIFS

Dans ce travail, nous avons entrepris de :

- Caractériser des échantillons de ferments lactiques importés utilisés dans l'industrie laitière algérienne pour la fabrication de différents produits laitiers fermentés (les yaourts et les fromages). Nous avons utilisé les techniques microbiologiques pour le contrôle de la qualité microbiologique des ferments et la caractérisation des espèces présentes dans les cultures mixtes ;
- Evaluer la susceptibilité de ces ferments à un panel de trois antibiotiques (Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline). Ces antibiotiques ont été sélectionnés sur la base de leur large spectre d'action et leur utilisation intensive par les praticiens vétérinaires dans la production laitière ;
- Réaliser une enquête Delphi afin de mieux caractériser le contexte industriel actuel et sonder les opinions des experts (industriels et chercheurs) par rapport aux risques perçus associés aux ferments importés et les défis faisant face au développement de ferments lactiques autochtones.

INTERET DE L'ETUDE

La résistance des ferments lactiques aux antibiotiques pourrait représenter un avantage technologique étant donné que ça leur confère une robustesse convoitée par les industriels. Cependant, ce type de ferments pourrait dissimuler des pratiques frauduleuses des producteurs laitiers (*eg.* lait contenant des résidus d'antibiotiques). En outre, le risque de transfert des gènes de résistance à la flore digestive humaine représente un danger potentiel pour la santé humaine. En Algérie, il existe un réseau national de surveillance de la résistance aux antibiotiques, cependant les activités de ce réseau accordent la priorité aux germes pathogènes. Un nombre de chercheurs algériens se sont également intéressés à ce domaine, toutefois la majorité des travaux consultés sont orientés vers la recherche de germes pathogènes résistants, le phénotypage des bactéries lactiques autochtones ou la détection de résidus d'antibiotiques dans différentes denrées alimentaires. Notre étude aborde le sujet d'une perspective différente : celle du risque de transfert de la résistance aux antibiotiques à la flore intestinale du consommateur des produits laitiers fermentés, par le biais des ferments lactiques importés. Nos résultats contribueraient éventuellement à mettre en exergue la nécessité de mettre en œuvre, au niveau national, les mécanismes nécessaires pour élargir la surveillance de l'émergence de la résistance aux antibiotiques aux microorganismes généralement reconnus comme sûrs telles que les bactéries lactiques. Notre travail a également pris en considération le contexte industriel actuel et ce afin d'identifier les potentialités de développement d'une industrie nationale de fabrication de ferments lactiques autochtones. Nous estimons que cette approche constituerait une démarche durable pour assurer une meilleure maîtrise de la qualité tout au long de la chaîne de production des produits laitiers fermentés.

Synthèse bibliographique

CHAPITRE I : INDUSTRIE DE TRANSFORMATION LAITIÈRE

I.1 Généralités sur l'industrie laitière algérienne

Le développement du secteur agricole et agroalimentaire constitue un enjeu majeur pour l'Algérie sur le plan économique, politique et social. Le chiffre d'affaires réalisé par l'industrie agroalimentaire représente 40% du total du chiffre d'affaires des industries algériennes hors hydrocarbures (**Kaci et Sassi, 2007**). La consommation des produits laitiers a connu une croissance continue; l'Algérie étant le premier consommateur de lait au sein du grand Maghreb, cette filière est menacée par la conjoncture actuelle : les entreprises évoluent de plus en plus dans des environnements où les avancées technologiques et l'innovation sont des facteurs essentiels pour l'obtention d'avantages concurrentiels (**Amellal, 1995**).

En Algérie, le produit fabriqué est, en majeure partie, un lait reconstitué en usine. Il peut être entier (28g/L de matière grasse), partiellement-écrémé (15 à 20g/L de matière grasse) ou écrémé (0g/L de matière grasse). Ce lait est ensuite conditionné en sachet polypropylène, en bouteille et tétra-pack (**Kaci et Sassi, 2007**). Les fabricants de lait offrent essentiellement du lait pasteurisé conditionné en sachet. Certains fabricants ont innové par :

- le conditionnement de lait entier,
- la production du lait UHT.

Le second stade du processus de fabrication consiste à la transformation du lait en produits laitiers. L'industrie de transformation demeure fortement dépendante des importations. Ce constat est corroboré par l'analyse de la structure des approvisionnements des entreprises. Les inputs en provenance du marché local concernent essentiellement, le lait cru local, le sucre et les emballages. Quelques grandes firmes dominent le marché, notamment Danone et Soummam qui totalisent à toutes deux plus de 50% des parts du marché national. Selon les enquêtes de consommation de l'Office national des statistiques (ONS), la consommation moyenne a fortement augmenté, enregistrant une croissance de 35% durant la période 1980 - 2000 (Tableau 1).

**Tableau 1: Évolution de la consommation du lait et dérivés selon l'ONS
(Kaci et Sassi, 2007)**

	1979	1988	2000
	Consommation (kg/an/habitant)		
<i>Total lait et dérivés</i>	61,35	71,94	82,60
<i>Lait pasteurisé</i>	15,28	28,84	34,20
<i>Lait frais</i>	21,68	9,94	11,40
<i>Lait concentré</i>	4,80	0	0
<i>Lait en poudre</i>	0,45	4,15	12,30
<i>Lait fermenté (Lben et Raïb)</i>	9,91	7,51	8,50
<i>Produits laitiers</i>	9,23	21,50	16,20

Cet accroissement s'est accompagné d'un changement dans la structure de consommation :

- Forte progression du lait pasteurisé (+22,4%),
- Forte baisse du lait frais (-53%),
- Apparition et développement du lait en poudre,
- Forte augmentation des produits laitiers (+76%).

Le procédé de fabrication des produits laitiers a pour matière première de base le lait (essentiellement le lait de vache). Le premier stade de transformation est le traitement thermique du lait (pasteurisation, stérilisation ou upérisation), combiné à une opération d'écémage. La chaîne de fabrication est composée de deux stades de transformation physico-chimique et microbiologique : la pasteurisation (lait) et la transformation (produits laitiers) (**Chisti, 2004**). La Figure 1 est une représentation simplifiée de la filière lait allant jusqu'à la transformation laitière.

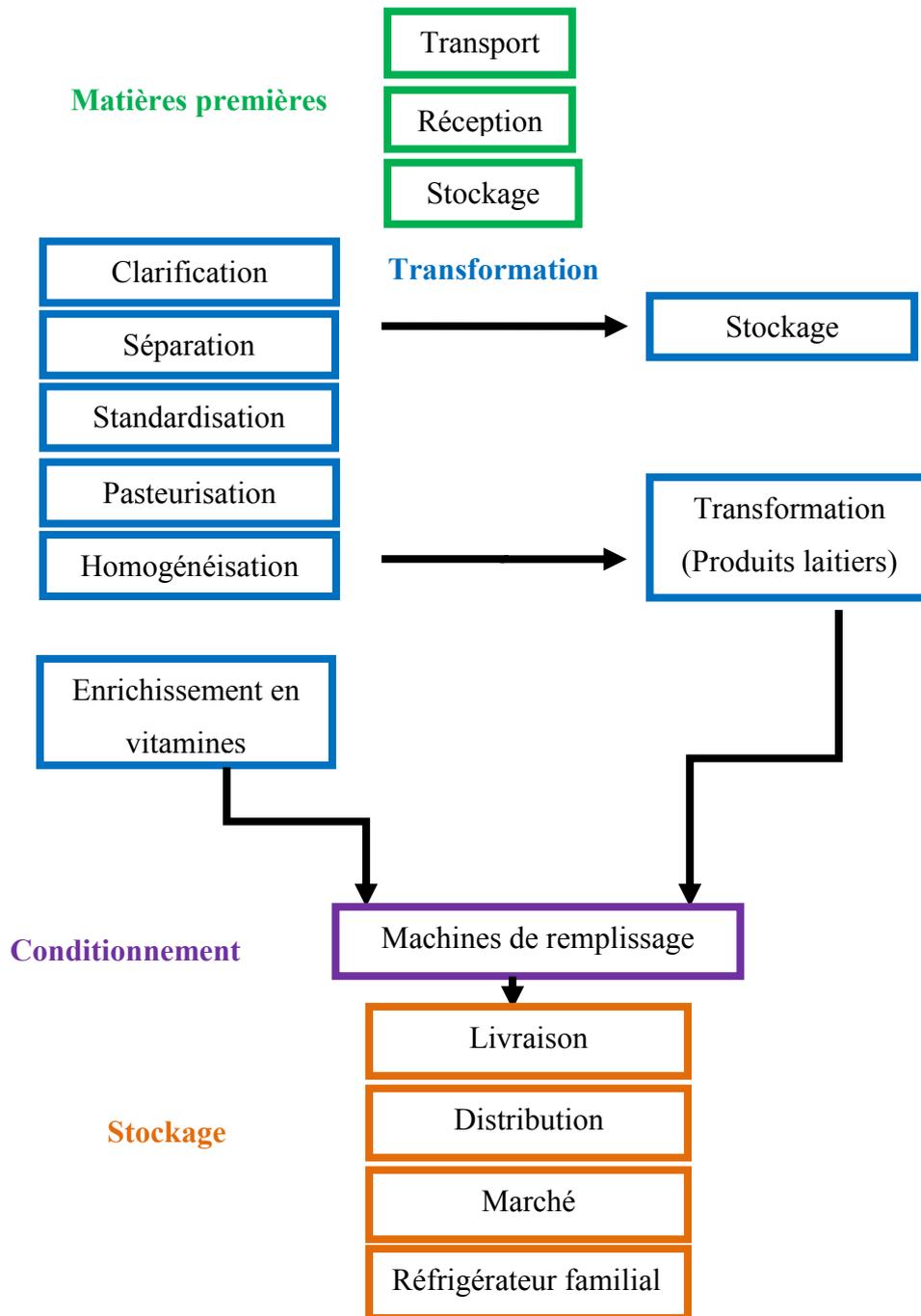


Figure 1 : Schéma général de la filière lait (Chisti, 2004)

I.2. Produits laitiers fermentés

Une large gamme de produits laitiers fermentés est commercialisée à travers le monde. Il existe un grand nombre de laits fermentés provenant de plusieurs pays et qui diffèrent par leur matière première, leur flore microbienne, leur technologie, leur texture, leur goût et leur durée de conservation. Le Tableau 2 donne une description de différents types de laits fermentés et leurs pays d'origine.

Tableau 2: Exemples de produits laitiers fermentés et leurs pays d'origine (INRA, 2009)

Nom	Description	Pays présumé d'origine	Ferment(s) impliqué(s)
Yoghourt/ Yaourt	Produit ferme ou brassé, arôme caractéristique.	Asie, Balkans	<i>S. thermophilus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> (+ <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium</i> ssp.)
Lait à l'<i>acidophilus</i>	Produit ferme, brassé ou liquide, faible arôme.	Etats-Unis	<i>Lb. acidophilus</i>
Kéfir	Boisson brassée, consistance crémeuse, arôme et gout caractéristique (CO ₂).	Caucase	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lb. kéfir</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> ssp., levures
Koumis	Boisson pétillante, acide, gout rafraîchissant et arôme caractéristique.	Mongolie	<i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , levures
Lassi	Boisson laitière aigre diluée avec de l'eau, consommée sale, épicée ou sucrée.	Inde	<i>Lactococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Leuconostoc</i> ssp., levures
Dahi	Produit ferme ou brassé, ou boisson liquide, flaveur agréable, acide ou faiblement acide.	Inde	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lc. diacétylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> ssp.
Leben	Produit ferme ou brassé, gout et arôme agréable.	Moyen orient	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lc. lactis</i> , levures
Filmjöl	Boisson brassée, visqueuse, saveur acidulée.	Suède	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. diacétylactis</i> , <i>Ln. cremoris</i>
Villi	Produit brassé visqueux, acidulé et gout agréable	Finlande	<i>Lc. lactis</i> , <i>Lc. cremoris</i> , <i>Lc. diacétylactis</i> , <i>Lc. dextranicum</i> , moisissure (<i>Geotrichum candidum</i>)

Les produits laitiers fermentés commercialisés en Algérie sont représentés essentiellement par le lait fermenté (*L'ben*, *Raïb*), le yaourt et le fromage.

1.2.1. Lait fermenté

Les laits fermentés sont des produits laitiers transformés par une fermentation essentiellement lactique qui aboutit à l'acidification et à la gélification du lait (Béal et Sodini, 2012). Les laits fermentés algériens sont le *L'ben* et le *Raïb*.

1.2.1.1. *L'ben*

L'origine de ce produit remonte à des temps immémoriaux, probablement à l'époque où l'homme a commencé à domestiquer les espèces laitières et à utiliser leurs laits. Sa fermentation lactique lui donne son arôme naturel et sa saveur inimitable. Sa préparation artisanale est simple, le lait est abandonné à lui-même jusqu'à sa coagulation. Celle-ci se fait à température ambiante et dure 24 à 48 h selon la saison. Le barattage qui lui succède dure 30 à 40 minutes. A la fin du barattage, on ajoute généralement un certain volume d'eau (environ 10 % du volume du lait), chaude ou froide, suivant la température ambiante, de façon à ramener la température de l'ensemble à un niveau convenable au rassemblement des grains de beurre (**Ouadghiri, 2009 ; Benkerroum et Tamime, 2004**).

Le *L'ben* est produit également à l'échelle industrielle. C'est un lait pasteurisé fermenté. L'acidification est provoquée par ensemencement des ferments lactiques mésophiles. Le lait qui sert à la préparation du *L'ben* est reconstitué. Il subit une pasteurisation à 84°C pendant 30 secondes, puis refroidi à 22°C et ensemencé de levain lactique (*Streptococcus cremoris ; Streptococcus lactis et Streptococcus diacetylactis ; Leuconostoc dextranicum, Ln. citrovorum et Ln. mesenteroides*) (**Benkerroum et Tamime, 2004**).

1.2.1.2. *Raïb*

Le *Raïb* fait partie des produits laitiers fermentés populaires en Algérie, en plus du *L'ben* (lait écrémé fermenté). Le *Raïb* a une très ancienne tradition en Algérie; il est fabriqué à partir du lait cru de vache ou de chèvre. La fermentation du lait, comme de nombreux procédés traditionnels de fermentation, est spontanée et incontrôlée et pourrait être une source précieuse des bactéries lactiques autochtones (**Mechai et Kirane, 2008**). Contrairement au *L'ben*, le *Raïb* ne subit pas une opération de barattage et d'écémage, il s'agit d'un lait fermenté entier.

1.2.2. *Yaourt*

Le yaourt est un lait fermenté obtenu exclusivement par la coagulation du lait sous l'action de deux bactéries : *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (**Quiberoni et al., 2010 ; Iyer et al., 2009 ; De Vuyst et Tsakalidou, 2008 ; Delorme, 2008; Michaylova et al., 2007**) (Tableau 3). Ces bactéries doivent être vivantes dans le produit et leur nombre doit dépasser dix millions par gramme de yaourt à la date limite de conservation (**Hols et al., 2005; Pfeiler et Klaenhammer, 2007; Champagne et al., 2009**).

Tableau 3: Composition recommandée et optionnelle des ferments du yaourt (Hui, 1992)

Composition standard recommandée par la FDA	Ferments additionnels du yaourt
<p><i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> (St.)</p> <p><i>Lactobacillus delbruckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> (Lb.)</p>	<p><i>Lactobacillus acidophilus</i></p> <p><i>Lactobacillus casei</i></p> <p><i>Lactobacillus helveticus</i></p> <p><i>Lactobacillus jugurti</i></p> <p><i>Lactobacillus lactis</i></p> <p><i>Bifidobacterium longum</i></p> <p><i>Bifidobacterium bifidum</i></p> <p><i>Bifidobacterium infantis</i></p>

La principale préoccupation des industriels est d'obtenir régulièrement un produit de bonne qualité. Cet objectif implique:

- Un ajustement de la qualité du lait utilisé;
- La connaissance des propriétés des cultures bactériennes employées;
- La maîtrise des différentes étapes de la fabrication du yaourt.

En effet, ces trois paramètres affectent le déroulement normal de la fermentation du yaourt. Les propriétés fermentaires aromatiques et épaississantes des bactéries lactiques du yaourt confèrent au produit final ses caractéristiques organoleptiques. Les résultats de recherche ont montré que la production d'acide et la production d'acétaldéhyde de la culture mixte de *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* sont beaucoup plus importantes que celles des cultures pures, on peut également observer un effet synergique marqué sur la consistance et la viscosité du produit lorsqu'on emploie des cultures épaississantes bonnes productrices d'exopolysaccharides (EPS) (Yildiz, 2010; Ravin *et al.*, 2006; Hui, 1993).

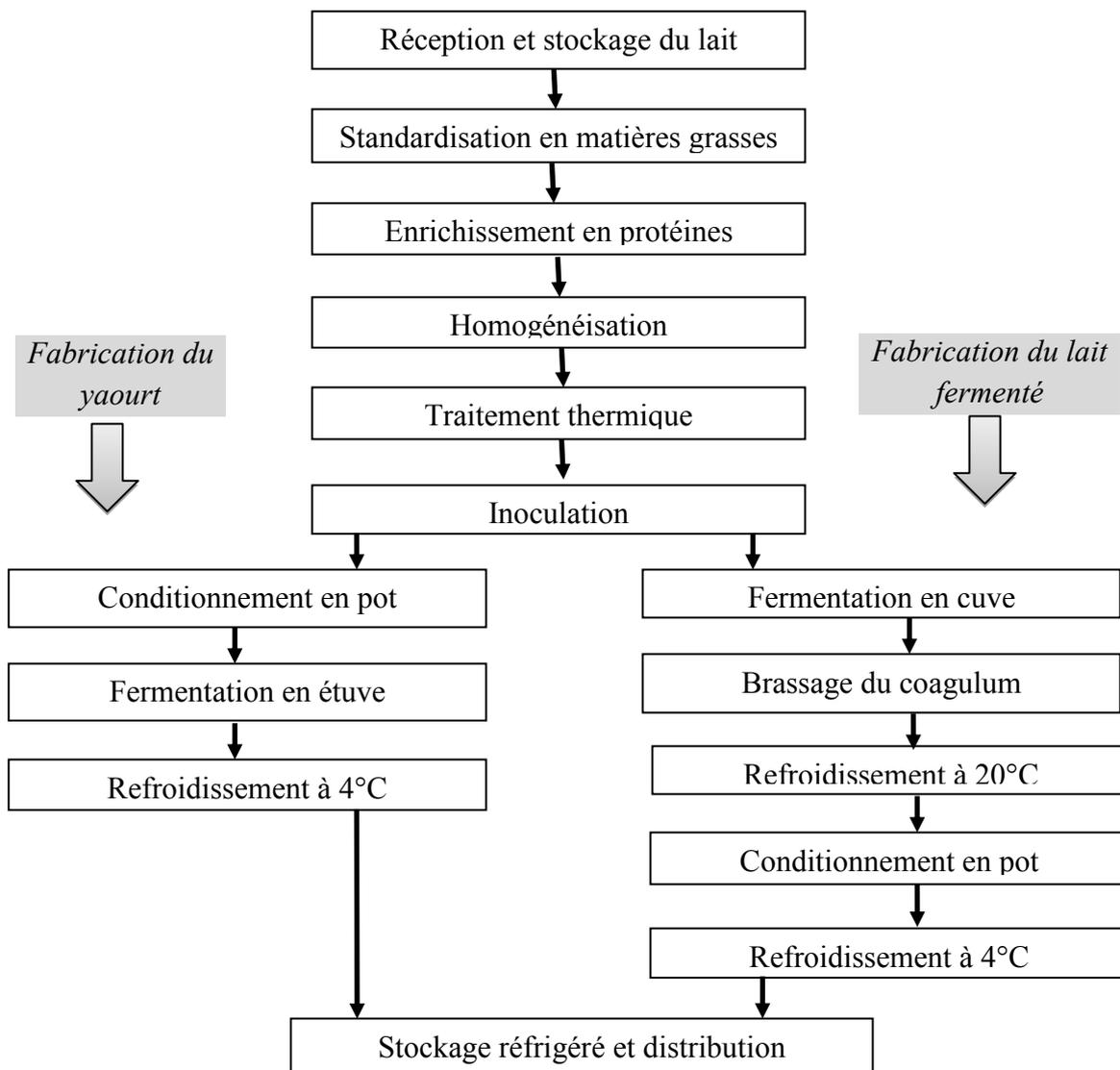


Figure 2: Diagramme général de fabrication des yaourts et des laits fermentés (Béal et Sodini, 2012)

Les deux principaux types de yaourt sont le *yaourt brassé* et le *yaourt ferme*. Les Figures 2– 3 montrent les différentes étapes de production des yaourts et laits fermentés et des deux types de yaourt respectivement.

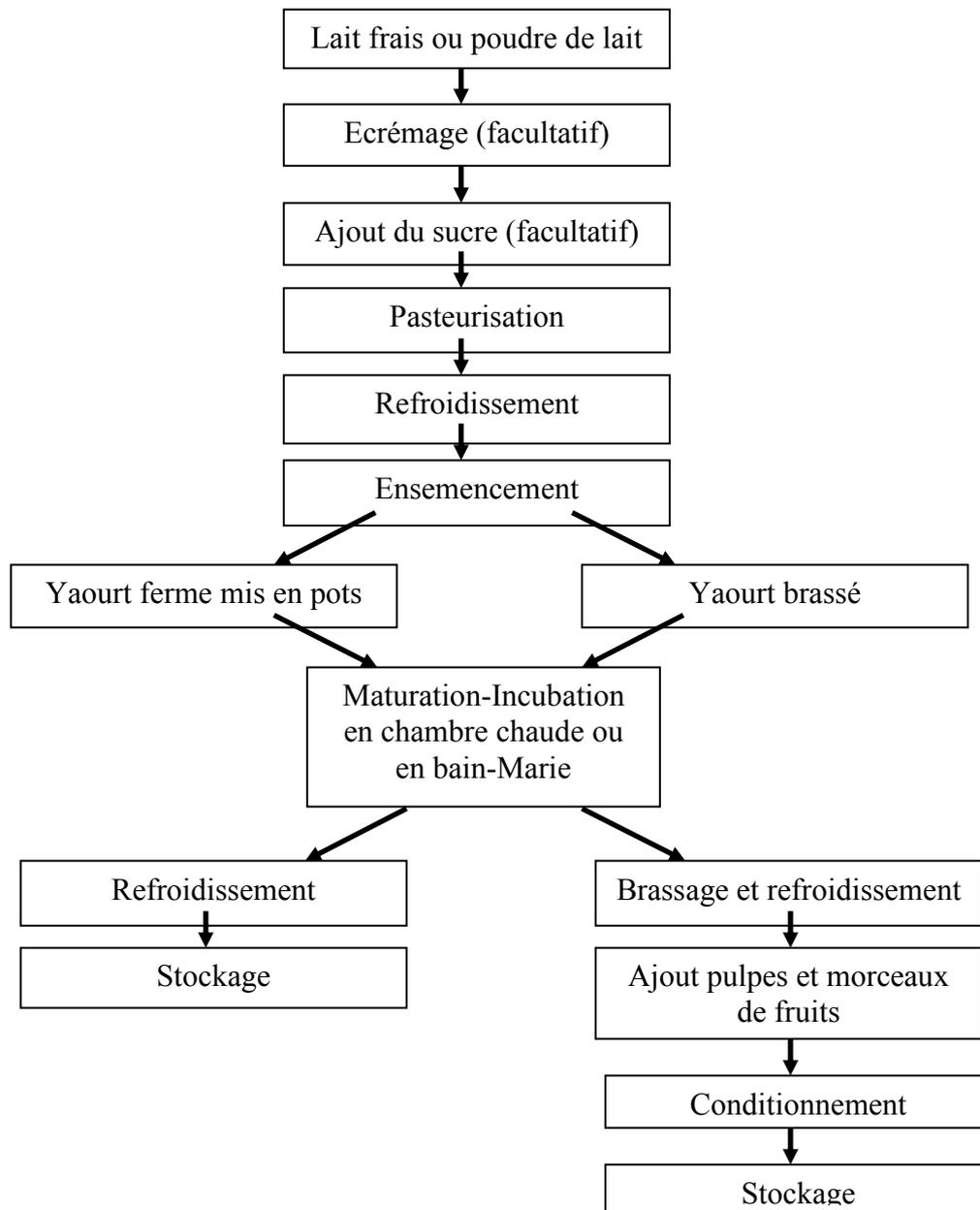


Figure 3: Diagramme simplifié de la production du yaourt (Yildiz, 2010)

1.2.3. Fromage

Le but de l'industrie fromagère est de transformer le lait en un produit d'utilisation prolongée et de goût différent grâce à diverses actions microbiennes et enzymatiques (Leroy et De Vuyst, 2004; Hui, 1993). La coagulation du lait et l'égouttage du caillé obtenu, représentent, en effet, une sorte de concentration, qui constitue un moyen de conservation auquel il faut ajouter l'acidification provoquée par la fermentation lactique, qui s'oppose à l'envahissement du fromage par les bactéries de putréfaction (Yildiz, 2010; Iyer *et al.*, 2009; Keoghane *et al.*, 2009; Parente et Cogan, 2004). Ce double principe de dessiccation et d'acidification va se retrouver, plus ou moins prononcé dans la préparation de tous les fromages (Leroy et De Vuyst, 2004). La transformation du lait en fromage

comporte quatre étapes essentielles (voir Figure 4). Dans le cas d'un fromage frais, la fabrication est terminée après l'égouttage (Yildiz, 2010; Parente et Cogan, 2004).

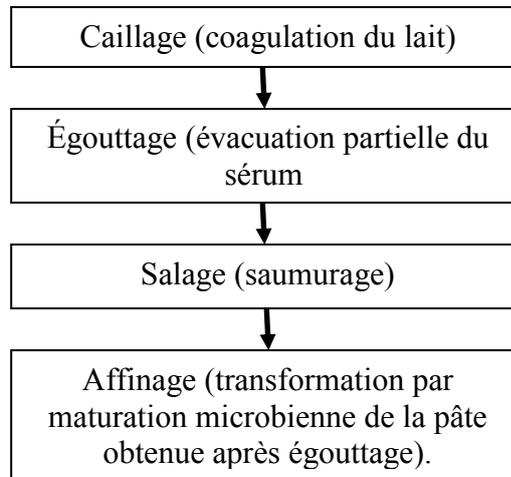


Figure 4 : Étapes essentielles de transformation du lait en fromage (Parente et Cogan, 2004)

Il existe environ 4000 variétés de fromages dans le monde, toutes élaborées en quatre étapes selon un même procédé. Les interventions particulières que l'on effectue à certaines étapes déterminent telle ou telle variété. Par conséquent, on a pu classer les fromages en un nombre restreint de catégories. Il y a eu plusieurs classifications parmi lesquelles celle de Keilling (1947) est la plus appropriée, tant elle est simple et pratique (Yildiz, 2010). Cette classification repose sur des différences technologiques qui déterminent les catégories de fromages décrites dans le Tableau 4:

Tableau 4: Classification des différents types de fromages et micro-organismes utilisés dans leur fabrication

Type de fromage	Description	Micro-organismes utilisés	Références
Fromages à pâte fraîche	Fromages peu égouttés qui n'ont pas été affinés, il y'a juste coagulation des protéines du lait sous l'effet des ferments lactiques (acidification).	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis diacetylactis</i> .	Chamba et Irlinger, 2004
Fromages à pâte ferme	Constitués d'une pâte compacte, renfermant un peu moins d'eau que les fromages frais, mais contenant plus de sels minéraux dont les sels de calcium notamment. Dans cette catégorie, on distingue : - les fromages à pâte ferme non cuite (Edam, Saint-Paulin, etc.) - les fromages à pâte ferme cuite (Gruyère, Conti, etc.)	<i>Lactococcus lactis cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , levures, moisissures diverses.	Parente et Cogan, 2004 Yildiz, 2010
Fromages à pâte molle	Fromages ayant subi un affinage relativement prolongé (protéolyse et lipolyse intenses par la flore de surface) après une fermentation lactique (ex. Camembert).	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Brevibacterium linens</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium camemberti</i> , levures.	Branger, 2012 Yildiz, 2010
Fromages à pâte persillée	Fromages affinés, à moisissures interne (ex. Roquefort). Il y'a développement interne de <i>Penicillium roqueforti</i> grâce à l'action de <i>Leuconostoc</i> et des levures qui produisent une ouverture et une petite quantité d'éthanol.	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactococcus lactis cremoris</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , levures.	Settanni et Moschetti, 2010
Fromages fondus	Constitués d'un mélange de fromage(s), de beurre, de crème et de lait, pasteurisé (95°C) ou stérilisé (125°C). Appelés aussi <i>fromages remaniés</i> , ils sont de nombreux types dont certains sont obtenus après récupération des fragments de fromages à pâte ferme tel que le Gruyère et qui présentent certains défauts. En réalité, il s'agit plus d'une dissolution suivie d'une dispersion de protéines dans l'eau que d'une fonte qui, correspond au sens physico-chimique du terme, à la désintégration d'une structure solide cristalline par l'apport d'énergie thermique ou l'exercice d'une pression.	Pas d'ajout de ferments lactiques	Boutonnier, 2012

Les ferments du fromage sont constitués essentiellement par des Lactocoques, Leuconostocs, Lactobacilles et Streptocoques. Les cultures *starter* comprennent également des propionibactéries,

brevibactéries et des espèces de moisissure *Penicillium*. Ces derniers organismes sont utilisés en conjonction avec des bactéries lactiques pour donner au fromage des caractéristiques particulières. Les cultures *starters* utilisés dans la fermentation des différents fromages sont résumées dans le Tableau 5.

Tableau 5: Cultures starters des fromages (Hui, 1992)

Fromage	Ferment lactique ajouté
Cheddar, Colby	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
Swiss	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> ou <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>lactis</i> et <i>Propionibacterium</i> .
Parmesan, Romano	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> ou <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>lactis</i>
Mozzarella, Provolone	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> ou <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
Blue, Roquefort, Stilton	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Penicillium roqueforti</i>
Gorgonzola	<i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrückii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Lactococcus lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> ou les levures.
Camembert	Culture de <i>Lactococcus</i> , <i>Penicillium camemberti</i> .
Brick, Limburger	Mixture de culture de <i>Lactococcus</i> et <i>Streptococcus salivarius</i> ssp. <i>thermophilus</i> . <i>Smear</i> ou <i>brevibacterium linens</i> et levures.
Muenster, Gouda, Edam	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> avec <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> ou les cultures aromatiques de <i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i> et <i>Lactococcus lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>
Cream cheese	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , avec <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> ou les cultures aromatiques de <i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i> et <i>Lactococcus lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> .
Cottage cheese	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> et <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> .

CHAPITRE II: LES FERMENTS LACTIQUES

II.1. Généralités sur les ferments lactiques

Les ferments lactiques sont ajoutés au lait pour démarrer le procédé de fermentation. Ils sont employés pour la production d'une grande gamme de produits laitiers comme le fromage, le yaourt, le lait fermenté, le beurre et la crème (Chen, 2010; Hylckama Vliega et Hugenholtz van, 2007; Pfeiler et Klaenhammer, 2007; Wildman, 2007; Salminen *et al.*, 2004). Puisque la flore lactique originale du lait est soit inefficace, incontrôlable, imprévisible, ou bien détruite sous l'effet de traitements thermiques auxquels le lait est soumis, les ferments lactiques ajoutés au lait, suite à l'étape de pasteurisation, assurent une fermentation plus contrôlée et plus prévisible (Yildiz, 2010; Chamba, 2008; Makarova *et al.*, 2006; Badis *et al.*, 2005; Parente et Cogan, 2004).

Les adjonctions de ferments sont des cultures choisies pour des buts autres que la formation d'acide, qui est une tâche exclusivement réservée aux cultures *starters* primaires (Carminati, 2010; Robinson, 2002). Les adjonctions de ferments peuvent être employées en tant que cultures de maturation (*i.e.* pour accélérer la maturation ou produire des saveurs souhaitables), ou elles peuvent également contribuer à la sûreté microbienne ou pour offrir d'autres effets bénéfiques pour la santé. La forme non-*starter* des ferments est largement utilisée au cours de la maturation de la plupart des variétés de fromages pendant la maturation des fromages (Carminati, 2010; Mozziet *al.*, 2010; Yıldiz, 2010; Chamba et Irlinger, 2004; Robinson, 2002).

II.1.1. Définition

Un ferment lactique est une préparation comprenant un grand nombre de micro-organismes (une seule espèce ou plusieurs), qui est ajoutée au lait pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son processus de fermentation (Yildiz, 2010; Leroy et De Vuyst, 2004). La production des ferments lactiques est fondée sur la technique de la « culture pure » initialement élaborée par Robert Koch. Dans une culture pure, chaque colonie microbienne se compose de cellules qui proviennent toutes de la même cellule. Ceci assure que les cultures ne sont pas un mélange de différents micro-organismes inconnus et elles peuvent donc être dénombrées et exploitées pour produire les réactions biochimiques prédéterminées (Solieri et Giudici, 2009; Chamba, 2008; Makarova *et al.*, 2006; Parente et Cogan, 2004).

II.1.2. Taxonomie des micro-organismes utilisés dans l'industrie laitière

II.1.2.1. Levures:

Les levures sont des micro-organismes largement utilisés aux procédés de production de produits laitiers notamment les fromages (fromages à pâtes molles à croûte fleurie, fromages à pâtes molles à croûte lavée, fromages à pâtes persillées, fromages à pâtes pressées). Et pour la production de certains laits fermentés (*Candida kéfir*, *Torulopsis kéfir*). Les levures interviennent essentiellement par production d'éthanol (Branger, 2012).

II.1.2.2. Moisissures:

Les moisissures sont utilisées également pour la production d'une large gamme de fromages (fromages à pâtes molles à croûte fleurie, fromages à pâtes molles à croûte lavée, à pâtes persillées, fromages à pâtes pressées) (Ray et Bhljnia, 2008; Baduel, 2002; Robinson, 2002). Les espèces les plus couramment utilisés sont *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti* (Branger, 2012).

II.1.2.3. Bactéries:

Les bactéries lactiques utilisées dans l'industrie laitière sont restreints à cinq genres principaux (voir Tableau 6): *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* et *cremoris*; *Streptococcus thermophilus*; *Leuconostoc* espèces *lactis*, *mesenteroides* ssp. (*cremoris* et *dextranum*) et *pseudomesenteroides*; *Enterococcus faecalis* et *faecium*; et plusieurs espèces de *Lactobacillus*, notamment, *delbruekii* ssp. *bulgaricus*, *casei*, *brevis*, *helveticus*, *rhamnosus*, *acidophilus*, *fermentum*, *curvatus*, *johnsonii*, et *gasseri* (Shetty et al., 2006).

Tableau 6: Classification des ferments utilisés dans l'industrie laitière (Robinson, 2002 ; Ray et Bhljnia, 2008)

	Microflore traditionnelle	Espèces bactériennes incorporées aux ferments lactiques
Genres	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactococcus</i> - <i>Leuconostoc</i> - <i>Pediococcus</i> - <i>Streptococcus</i> - <i>Lactobacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Bifidobacterium</i> - <i>Enterococcus</i> - <i>Propionibacterium</i> - <i>Brevibacterium</i> - Levures - Moisissures

Les ferments lactiques et les micro-organismes associés et leurs produits fermentés sont décrits dans le Tableau 7.

Tableau 7: Cultures starters, micro-organismes associés et leurs applications en industrie laitière (Hui, 1992)

Ferments lactiques	Micro-organismes associés	Produits
Mésophiles <i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>S. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>	<i>S. lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Penicillium camemberti</i> <i>P. roqueforti</i> , <i>P. caseicolum</i> , <i>Brevibacterium linens</i> .	Cheddar, Colby, Cottage cheese, Cream cheese, Neufchatel, Camembert, Brie, Roquefort, Blue, Gorgonzolla, Limburger.
Thermophiles <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida kefir</i> , <i>Torulopsis</i> sp., <i>L. brevis</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Propionibacterium fureudenreichii</i> , <i>P. shermanii</i>	Yaourt, Parmesan, Romano, Grana, Koumiss, Kéfir, Yakult, Therapeutic cultured milk, Swiss, Emmental, Gruyère.
Mix de starters <i>S. lactis</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. bulgaricus</i> .		Modified cheddar, Mozzarella Italien, Pasta filata, Pizza cheese.

II.1.3. Rôle des ferments

La pasteurisation du lait réduit fortement la microflore indigène, le rôle principal des ferments est par conséquent d'initier et conduire le procédé de fermentation selon les propriétés souhaitées dans le produit fini (Carminati *et al.*, 2010; Mozzi *et al.*, 2010; Saithong *et al.*, 2010; Hylckama Vliega et Hugenholtz *van*, 2007). Les ferments contribuent également aux caractéristiques organoleptiques, nutritionnelles et sensorielles des produits et à leur sûreté (Yildiz, 2010). L'impact sur la qualité du produit est fortement dépendant de la souche utilisée et varie entre les souches selon leurs activités et voies métaboliques (Hylckama et Hugenholtz, 2007). Les ferments sont utilisés en raison de leur capacité de production d'acide lactique à partir du lactose. De plus, ils possèdent d'autres fonctions importantes comme l'inhibition des micro-organismes indésirables, l'amélioration des propriétés sensorielles et rhéologiques, en plus de leurs bienfaits prouvés pour la santé.

Etant donné que les ferments commerciaux comportent des souches choisies d'espèces prédéfinies ayant des propriétés métaboliques connues, l'introduction de ces ferments a significativement amélioré la qualité commerciale et hygiénique des produits laitiers fermentés et a contribué à l'harmonisation des normes de qualité (Parente et Cogan, 2004).

II.1.4. Types de ferments

Les ferments peuvent être classés sur la base de leur fonction, leur température de croissance, ou leur composition. Avant l'arrivée de la biotechnologie moderne, des ferments artisanaux étaient utilisés. Bien qu'ils soient encore en usage, leur instabilité microbiologique a favorisé l'évolution de production de mélanges de bactéries lactiques prédéfinies afin d'obtenir une activité et une qualité d'acidification plus stables dans les produits finaux (**Marth et Steele, 2001**). Cependant, les ferments artisanaux représentent des sources potentielles de nouvelles souches de bactéries lactiques à intérêt commercial. Aujourd'hui, des cultures mono- ou multi- souches bien définies sont intensivement utilisées autour du monde pour produire des produits laitiers variés (**Brusetti et al., 2008 ; Uchida et al., 2007**). Ces cultures sont commercialisées sous forme de cellules concentrées congelées ou lyophilisées pour être directement introduites dans les cuves de fermentation (inoculation).

On distingue donc deux catégories principales de ferments: les ferments artisanaux utilisés dans les procédés traditionnels et les ferments commerciaux utilisés dans les procédés modernes:

II.1.4.1. Ferments artisanaux

Tous les ferments disponibles actuellement sont dérivés des *starters* artisanaux de composition non définie (contenant un mélange de différentes souches et/ou espèces non définies) (**Brusetti et al., 2008; Uchida et al., 2007**). La production de telles cultures, aussi définies comme « ferments naturels » est dérivée d'une pratique antique dénommée “ *back-slopping*” (l'utilisation d'un vieux batch d'un produit fermenté pour inoculer un produit neuf) et/ou par l'application des pressions sélectives (traitement thermique, la température d'incubation, baisse de pH) (**Carminati et al., 2010**). Aucune précaution spécifique n'est employée pour empêcher la contamination à partir du lait cru ou à partir de l'environnement de fabrication, et le contrôle du milieu et des conditions de culture pendant la production de *starters* est très limité (**Robinson, 2002**).

Deux sous-types de ferments (naturels) artisanaux sont identifiés, des *starters* du lait et des *starters* du lactosérum, selon le substrat et la technique utilisée pour leur reproduction, on trouve:

- *Cultures naturelles du lactosérum (Natural Whey Cultures, NWC)*: Les NWC sont préparées par l'incubation d'une partie du lactosérum vidangé de la cuve de fromage pendant la nuit sous conditions plus ou moins sélectives. Dans la fabrication des fromages Parmesan, Reggiano et Grana Padano, le lactosérum est enlevé de la cuve de fromage à la fin de l'opération de production du fromage à 50 – 54°C et incubé durant la nuit sous température contrôlée (45 °C), ou dans de grands récipients en lesquels la température diminue à 37 - 40 °C, à un pH final inférieur à 3,3 (**Carminati, 2010**).

- *Cultures naturelles du lait (Natural Milk Cultures, NMC)*: Les NMC sont encore employées dans de petites usines de fabrication de fromage en Italie pour la production de fromages traditionnels, et moins utilisées en Argentine. Une pression sélective est utilisée pour le développement de la microflore désirée et inclut la thermisation/pasteurisation du lait cru (62 – 65°C pendant 10-15 minutes) suivi d'une incubation à 37 - 45 °C jusqu'à atteinte de l'acidité désirée. La méthode employée pour les préparer et la composition microbiologique du lait cru utilisé détermine leur flore microbienne (**Carminati, 2010; Robinson, 2002**).

II.1.4.2. Ferments commerciaux

Les ferments commerciaux sont en général commercialisés sous forme lyophilisée et peuvent être utilisés pour l'inoculation directe de la cuve de fermentation (*Direct Vat Inoculation, DVI*). Ces ferments sont développés en grands volumes à partir d'une culture initiale définie ou non définie, concentrée (typiquement par centrifugation) et ensuite congelée ou lyophilisée pour le stockage et la distribution (**Robinson, 2002; Marth et Steele, 2001**). Le ferment concentré est directement introduit dans la cuve, ce qui évite la contrainte de la propagation sur place. Actuellement, les ferments de type DVI sont devenus plus accessibles vu l'amélioration des technologies de la concentration et la conservation de ces micro-organismes (**Carminati, 2010**).

Selon leur composition, les ferments commerciaux peuvent être classés en trois catégories : (i) les ferments purs, constitués d'une souche d'une seule espèce bien caractérisée, (ii) les ferments mixtes, dont la composition est partiellement ou non déterminée et (iii) les ferments mixtes sélectionnés, qui contiennent plusieurs souches bien définies issues d'une ou de plusieurs espèces (**Carminati et al., 2010; Corrieu et Luquet, 2008; Robinson, 2002**).

- *Cultures pures*: Plusieurs ferments lactiques disponibles sur le marché sont composés d'une seule souche pure lyophilisée, il s'agit des cultures *starters* pures (**Leroy et De Vuyst, 2004; Parente et Cogan, 2004**).
- *Cultures à variétés mélangées partiellement ou non définies*: Pour beaucoup de fromages, les ferments artisanaux ont été remplacés par les ferments à variétés mélangées commerciales (*Mixed Strain Starters, MSS*). Ces préparations sont dérivées des meilleures cultures naturelles et produites dans des conditions contrôlées par des entreprises spécialisées (**Robinson, 2002**). Bien que la composition des MSS soit non définie, leur production sous des conditions plus contrôlées réduit la variabilité intrinsèque liée à l'utilisation des ferments artisanaux (**Solieri et Giudici, 2009; Parente et Cogan, 2004; Limsowtin et al., 1996**).

- *Cultures mixtes de souches définies (DSC)* : Les cultures de souches définies (*Defined Strain Cultures*, DSC) permettent un plus grand contrôle de la composition et des propriétés du produit fini. L'examen des propriétés principales de chaque souche (potentiel génétique, caractéristiques biochimiques, cinétique de croissance, production acide...*etc.*) permet de définir un mélange de souches de façon à aboutir à un ensemble de propriétés souhaitables dans le produit fini (**Robinson, 2002**). Les DSC se composent d'une ou plusieurs souches choisies, maintenues, produites, et distribuées par des entreprises spécialisées. En raison de leur performance optimisée, ces ferments commerciaux ont remplacé les ferments traditionnels dans la production de plusieurs variétés de fromage. Puisque la souche et/ou le rapport d'espèces dans le DSC est défini, leur exécution technologique est extrêmement reproductible (**Carminati et al., 2010**). Cependant, dû au nombre limité de souches utilisées, l'infection par les bactériophages constitue un risque de rupture des fermentations (**Marino et al., 2003**).

- *Cultures spécialisées* : La recherche des souches ayant de nouvelles propriétés spécifiques afin de développer des ferments spécialisés peut mener à l'amélioration du procédé de fermentation et à l'augmentation de la qualité du produit final. À cet égard, l'utilisation des cultures spécialisées de bactéries lactiques ayant des caractéristiques originales est prometteuse en technologie laitière. Selon la fonction spécifique à accomplir, ces cultures spécialisées peuvent appartenir aux *starters* primaires (par exemple, les *starters* résistants aux bactériophages) ou une culture secondaire (définies également comme "adjonctions de *starters*") (**Carminati et al., 2010**).

 - Cultures résistantes aux phages : La coexistence prolongée des ferments lactiques et de bactériophages dans le même environnement a incité des souches de ferments lactiques à l'acquisition de systèmes de défense indigènes vers une série de bactériophages. Ces mécanismes incluent l'inhibition de l'adsorption du bactériophage, le blocage de l'injection de l'ADN, les systèmes de restriction/de modification (**Mozzi et al., 2010; Marth et Steele, 2001**).

 - Starters de souches de bactéries lactiques de type sauvage : L'isolement de souches de type sauvage des produits traditionnels est une méthode classique pour l'obtention de nouveaux ferments adaptés à la production d'aliments fermentés traditionnels (*ex.* produits de terroir). En employant les souches sauvages sélectionnées, la production à grande échelle des aliments fermentés traditionnels peut être développée sans perdre leurs saveurs uniques et caractéristiques particulières (**Sánchez et al., 2010**). Les

bactéries lactiques de type sauvage qui proviennent de l'environnement et des matières premières des aliments, servent de ferments naturels dans plusieurs types d'aliments traditionnels fermentés. Des études récentes se sont concentrées sur l'évaluation de souches sauvages isolées à partir de produits traditionnels pour le développement de nouveaux ferments (**Von Mollendorff, 2008**).

2.2. Technologie de production des ferments commerciaux

La production industrielle des ferments lactiques est généralement réalisée en cultures pures, discontinues ou continues, avec ou sans recyclage des cellules, à température et pH régulés et en anaérobiose. La fermentation est suivie des étapes de concentration (refroidissement, concentration par centrifugation ou ultrafiltration), de protection et de stabilisation (congélation ou lyophilisation). La conservation des ferments s'effectue à basse température, respectivement -45 °C pour les ferments congelés et 4°C pour les bactéries lyophilisées. Les bactéries sont ensuite utilisées en mélange, après décongélation ou réhydratation, pour la fabrication des produits fermentés. L'objectif visé par le producteur de ferments est d'obtenir des ferments lactiques concentrés d'une haute qualité, c'est à dire comportant un grand nombre de bactéries viables et présentant une activité métabolique la plus élevée possible. Cette problématique est complexe, du fait des caractéristiques génétiques et physiologiques variables des micro-organismes considérés, mais aussi des conditions de conduite des procédés (**Corrieu et Luquet, 2008**).

2.2.1. Modes d'ensemencement

Traditionnellement, les ferments lactiques étaient fabriqués dans l'usine dans laquelle ils étaient ensuite utilisés. Ils étaient conservés sur milieux solides, ou liquides, soit à 4 °C, soit sous forme congelée. Avant leur utilisation, ils étaient propagés sur un milieu nutritif, en plusieurs précultures successives, pour atteindre le volume nécessaire à l'ensemencement des cuves de fabrication (Figure 5). Actuellement, ces précultures subsistent chez certains producteurs notamment en fromagerie, malgré des inconvénients liés à leur lourdeur de mise en œuvre, leur répétabilité incertaine et les difficultés de maintien de l'hygiène au sein de l'unité de production (sensibilité aux infections phagiques) (**Corrieu et Luquet, 2008**).

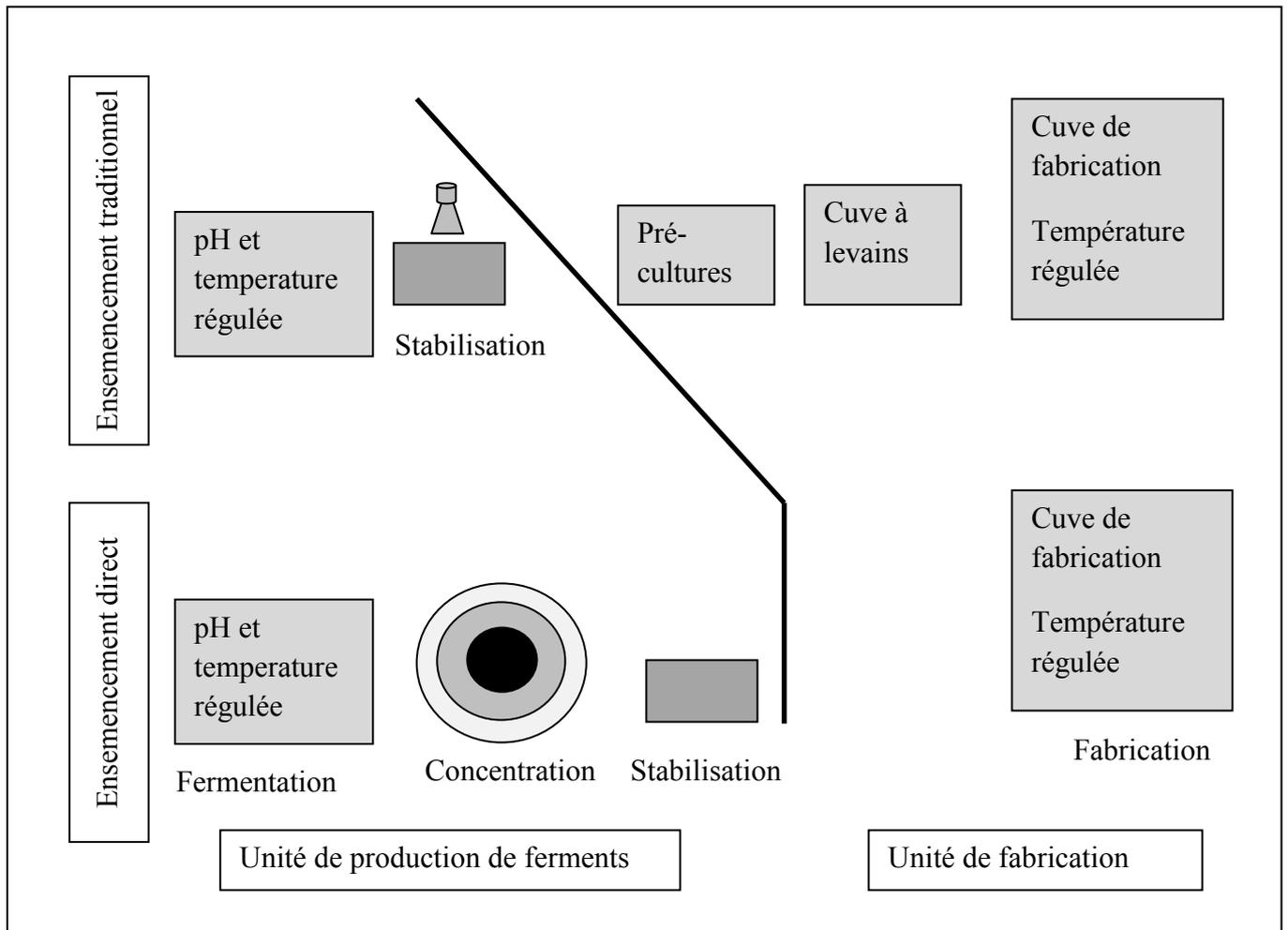


Figure 5 : Modes d'ensemencement traditionnel et direct : principales étapes de mise en œuvre par le producteur de ferments et par l'utilisateur (Corrieu et Luquet, 2008)

Afin de limiter la viabilité de ces ferments et d'accroître la sécurité des procédés, la production de ferments concentrés par ensemencement Direct ou DVI ('*Direct Vat Inoculation*' ou '*Direct set cultures*') s'est développée (Figure 5). Cet ensemencement est effectué par l'association de souches bien caractérisées et dont les propriétés sont connues de façon préalable. L'ensemencement direct ou semi-direct présente plusieurs intérêts:

- Simplicité d'utilisation des ferments, liée à la suppression des étapes de propagation;
- Limitation des risques de contamination;
- Contrôle facilité des bactériophages par simple rotation des cultures ;
- Flexibilité des plannings de fabrication, grâce à une disponibilité immédiate des ferments ;
- Performance dans la conduite du procédé de fabrication, liée à une meilleure standardisation des cinétiques d'acidification, une reproductibilité accrue des productions et une meilleure maîtrise des rendements ;

- Personnalisation des produits laitiers, grâce à la possibilité de réaliser des mélanges de souches « à la carte », d'une complexité variable, en fonction du produit désiré.

La maîtrise des coûts de production pour l'utilisateur des ferments diffère dans les deux situations (**Corrieu et Luquet, 2008**). Le Tableau 8 résume les différents coûts relatifs aux modes d'ensemencement traditionnel et direct.

Tableau 8 : Coûts liés aux modes d'ensemencement traditionnel et direct (moderne)

Mode d'ensemencement	Traditionnel	Direct
Coûts	<ul style="list-style-type: none"> - Investissements/ Infrastructures (salle à ferment, généralement chez la plupart des transformateurs) - Maintenance - Matériels de préparation des ferments (milieux d'élaboration, utilités, nettoyage) - Personnel (mise en œuvre, nettoyage). 	<ul style="list-style-type: none"> - Prix d'achat des ferments prêts à l'emploi - Coût de leur conservation

II.2.2. Diagramme général de production

La production industrielle des ferments lactiques concentrés se déroule selon les étapes illustrées dans la Figure 6 :

1. *Préparation du milieu de culture*: la préparation des milieux fait intervenir en premier lieu un choix raisonné des matières premières, en fonction des besoins des micro-organismes, du coût des constituants et du savoir-faire du producteur;
2. *Traitement thermique*: le milieu de culture constitué doit être traité thermiquement afin de le débarrasser des micro-organismes contaminants, puis refroidi à la température de fermentation. Son pH est ajusté à la valeur optimale pour la bactérie à cultiver ;
3. *Inoculation ou Ensemencement*: l'inoculum est constitué soit d'une préculture préalablement incubée, soit de bactéries congelées ou lyophilisées qui sont ajoutées directement dans le fermenteur (voir Figure 7). Quand les bactéries lactiques sont isolées pour être développées comme ferments, elles doivent démontrer une aptitude à être produites à grande échelle, pour résister au processus de lyophilisation et pour maintenir leur activité fonctionnelle (**Edward et al., 2010; Schwab et al., 2007**). La majorité des productions de ferments est effectuée en cultures pures, même si les cultures mixtes peuvent présenter un intérêt ;
4. *Fermentation*: la fermentation est généralement conduite en discontinu, dans des conditions contrôlées de température et de pH et sous une faible agitation. Une anaérobiose partielle ou totale peut être maintenue ;

5. *Concentration et récolte*: une étape de récolte et de concentration suit la phase de propagation des bactéries. Elle permet d'éliminer la majeure partie de l'eau contenue dans les milieux de culture et d'aboutir à une concentration cellulaire élevée. Elle est réalisée par centrifugation ou filtration tangentielle (**Luquet et Corrieu, 2008; Salminen et al., 2004**) ;
6. *Conditionnement*: la concentration des cellules est suivie de l'addition de molécules de protection, dont le rôle est d'aider les cellules à survivre et à se maintenir dans un état physiologique actif, à l'issue des étapes de stabilisation et de stockage ultérieures ;
7. *Stabilisation*: la stabilisation des bactéries concentrées protégées est réalisée soit par congélation, soit par lyophilisation. Les conditions de réalisation de ces opérations sont définies de façon à limiter les dommages cellulaires qu'elles entraînent ;
8. *Conditionnement final*: le conditionnement final des concentrés bactériens intervient soit avant, soit après l'étape de stabilisation, en fonction des conditions dans lesquelles, celle-ci est réalisée. Il peut être précédé d'une étape de mélange de plusieurs souches ;
9. *Stockage*: le stockage des ferments concentrés stabilisés est réalisé à température contrôlée, pendant une durée au moins égale à trois mois, selon les spécifications du producteur (**Corrieu et Luquet, 2008; Salminen et al., 2004**).

Ces différentes étapes sont conduites, chez les producteurs industriels, avec un triple souci:

- Atteindre de fortes concentrations bactériennes en fin de culture afin d'accroître les productivités ;
- Accéder à une qualité (viabilité et propriétés technologiques) des produits suffisamment grands pour répondre aux exigences des utilisateurs ;
- Travailler dans des conditions de reproductibilité élevée afin de sécuriser les procédés et les conditions de travail des personnels (**Corrieu et Luquet, 2008; Salminen et al., 2004**).

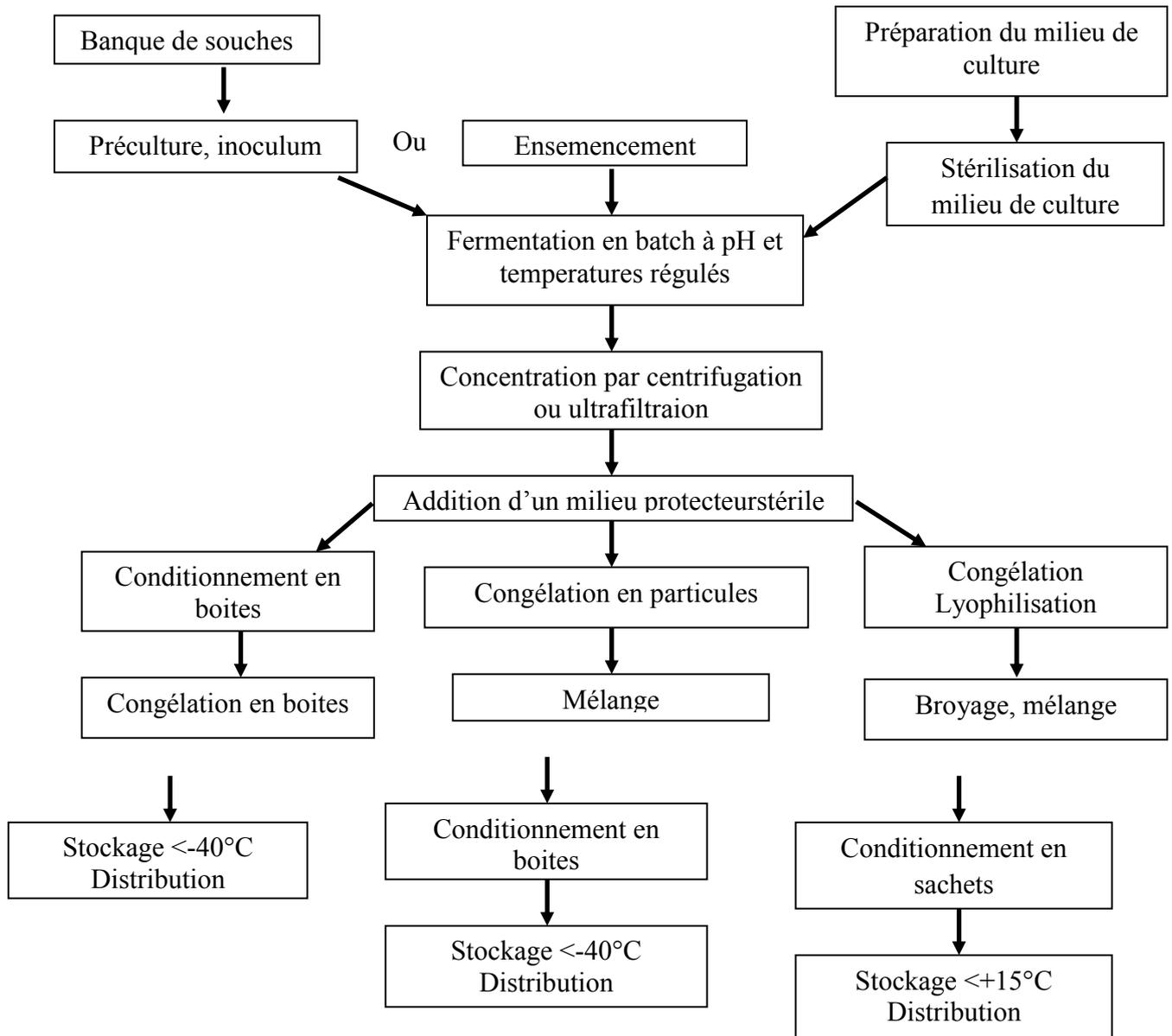


Figure 6 : Diagramme de production de ferments lactiques concentrés congelés ou lyophilisés (Corrieu et Luquet, 2008)

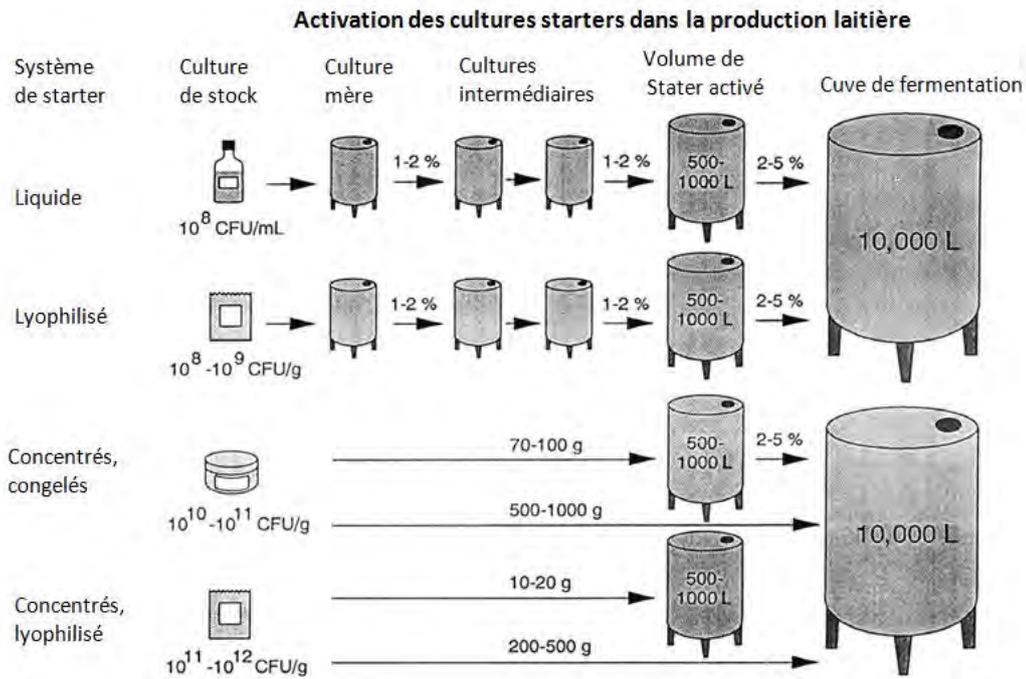


Figure 7 : Types de ferments utilisés dans la fabrication des produits laitiers fermentés et les étapes de culture dans le procédé industriel de fermentation (Salminen et al., 2004)

II.2.3. Conservation et modes de commercialisation des ferments

La commercialisation des ferments concentrés nécessite leur stabilisation préalable par congélation, soit par lyophilisation. Cette stabilisation permet de les conserver à la température préconisée, pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Les cultures concentrées congelées doivent être stockées à une température inférieure à -45 °C puis décongelées, soit avant l'ensemencement, soit directement lors de fabrication (Corrieu et Luquet, 2008).

Les deux formes commerciales présentent chacune des avantages et des inconvénients. Les coûts de fabrication des ferments congelés sont inférieurs à ceux des ferments lyophilisés. En effet, ces derniers associent, à l'étape de congélation préalable, une étape de déshydratation sous vide, longue et coûteuse tant en équipement qu'en fonctionnement. En outre, la reprise d'activité des ferments congelés est généralement plus rapide, bien que ce critère soit très dépendant des souches et des conditions mises en œuvre lors de leur conservation (Salminen et al., 2004).

A l'opposé, du fait de volumes de stockage plus faibles (liés au mode de conditionnement final) et de températures de conservation plus élevées, les coûts de stockage et de transport des ferments lyophilisés sont inférieurs à ceux des ferments congelés. Cela peut faciliter leur utilisation dans les contextes de production où la mise en œuvre de basses températures est plus difficile (pays chauds).

Un ferment lyophilisé peut, en outre, être stocké plusieurs années à basse température (**Corrieu et Luquet, 2008; Salminen *et al.*, 2004**). Cependant, même à l'état sec, on observe une perte de viabilité pendant le stockage, et la survie des bactéries stockées dépend de plusieurs facteurs tels que la concentration initiale en cellules, l'état et le milieu de croissance, les conditions de séchage, le milieu de lyophilisation, les conditions de stockage et de réhydratation (**Kurtmann *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009**).

II.3. Qualité et critères de sélection des ferments lactiques

La sélection d'un ferment lactique est réalisée soit par l'utilisateur potentiel, soit par le producteur de ferments, sur la base d'un cahier des charges généralement fixé par l'utilisateur. Cette sélection s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois aux spécifications demandées par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur (**Corrieu et Luquet, 2008; Robinson, 2002**). Ces critères relèvent habituellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leurs performances, de leurs propriétés probiotiques éventuelles et de leur sécurité. Ils diffèrent selon le type de produit désiré, les caractéristiques des matières premières à transformer et la technologie appliquée. Il importe également de s'assurer de la faisabilité économique de la propagation de la souche : coûts des milieux, mise en œuvre pratique de la culture, mise en œuvre de la phase de stabilisation. Enfin, leur robustesse, notamment lors des différentes phases de leur production, constitue le critère ultime de sélection (**Corrieu et Luquet, 2008; Robinson, 2002**).

Le Tableau 9 présente des exemples de critères recherchés dans les ferments utilisés dans l'industrie laitière.

Tableau 9: Exemples de critères de choix des ferments utilisés dans l'industrie laitière (Branger, 2007)

Critères	Bactéries lactiques	Corynébactéries	Levures	Moisissures
Conditions de croissance	<ul style="list-style-type: none"> - Température optimale et cycle thermique - Croissance à basse température - Comportement en présence d'autres bactéries (effets synergiques, symbioses, antagonismes). 	<ul style="list-style-type: none"> - pH optimal et minimal - Comportement à +4°C - Croissance à 10-15°C - Comportement en présence de levures et/ou moisissures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Adaptation à des températures basses ou élevées - Exigences faibles en éléments nutritifs - Comportement en présence de bactéries lactiques et propioniques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Vitesse de germination et de croissance - Température - Comportement en présence d'autres micro-organismes.
Productions ou caractères particuliers	<ul style="list-style-type: none"> - Capacité acidifiante - Production de polysaccharides (dextranes) - Arômes - Potentiel amino-peptidasique - Potentiel protéolytique - Bactériocines. 	<ul style="list-style-type: none"> - Pigmentation non photo-dépendante - Activité caséolytique - Activité amino-peptidasique - Activité lipolytique - Arômes - Activité déméthiolase 	<ul style="list-style-type: none"> - Taux d'éthanol - Rendement en éthanol - Production élevée en glycérol - Esters lourds - Phénotype « Killer » - Dégradation de l'acide malique - Caractère agglomérant - Propriétés protéolytiques - Action sur les polyphénols. 	<ul style="list-style-type: none"> - Morphologie (feutrage ras, dense, aéré) - Couleur et stabilité au vieillissement - Sporulation souhaitée (<i>Penicilliumroqueforti</i>) - Ou non (<i>Penicilliumcamemberti</i>) - Activité protéolytique - Activité lipolytique.
Caractères non recherchés	<ul style="list-style-type: none"> - Production de peptides amers. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production de sulfures. 	<ul style="list-style-type: none"> - Production d'écume - Production d'acide acétique - Production d'acétate d'éthyle (acidité volatile) - Production de H₂S et de mercaptans - Production trop importante d'alcools supérieurs. 	<ul style="list-style-type: none"> - Goûts indésirables.

II.3.1. Critères de sécurité

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et/ ou générer des substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (*Generally Recognized As Safe*), à l'exception de certains entérocoques (Delorme, 2008; Corrieu et Luquet, 2005; Renault, 2002). Les préparations de ferments commerciaux doivent, en outre, être exemptes de substances infectieuses ou susceptibles de provoquer des problèmes d'hygiène. Elles ne doivent pas contenir de contaminants tels que des coliformes, des levures ou des moisissures. Ainsi selon la Fédération Internationale de Laiterie (IDF, 1997), les ferments doivent satisfaire aux spécifications indiquées dans le Tableau 10 :

Tableau 10 : Spécifications microbiologiques des ferments lactiques (Corrieu et Luquet, 2008)

Type de contaminant	Ferments non concentrés		Ferments concentrés	
	Congelés	Lyophilisés	Congelés	Lyophilisés
<i>Bactéries non lactiques</i>	<50	<50	<500	<500
<i>Levures et moisissures</i>	<1	<10	<1	<10
<i>Coliformes</i>	<1	<1	<1	<10
<i>Entérocoques</i>	<10	<10	<10	<100
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1	<10	<1	<10
<i>Salmonella ssp.</i>	Absence dans 25 g de produit			
<i>Listeria monocytogenes</i>	Absence dans 1 g de produit			

II.3.2. Fonctionnalités technologiques

Les fonctionnalités technologiques des ferments lactiques relèvent les propriétés suivantes :

- *Activité acidifiante* : il s'agit, pour un ferment donné, de permettre une vitesse d'acidification élevée et/ou d'atteindre un niveau d'acidité finale prédéfinie. Ce niveau d'acidité finale dépend des spécificités du produit, lesquelles vont conditionner le choix des souches ;
- *Métabolisme des sucres* : le choix d'un ferment est conditionné par son aptitude à produire, soit de l'acide lactique presque exclusivement (métabolisme homofermentaire), soit de l'acide lactique et d'autres produits finaux tels que l'éthanol et le CO₂ (métabolisme hétérofermentaire) ;
- *Propriétés protéolytiques et peptidasiques*: les bactéries démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée ;
- *Propriétés lipolytiques* : généralement faibles chez les bactéries lactiques, elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères ;
- *Activité gazogène* : certains ferments lactiques sont capables de produire du CO₂ à partir d'une source de carbone, participant ainsi à la formation d'ouvertures dans les fromages ;

- *Production de composés d'arômes* : cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurres, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne ;

- *Production de polysaccharides exocellulaires* : il s'agit de sélectionner des ferments capables de produire, en quantité et en qualité, des exopolysaccharides qui vont accroître la viscosité du produit (cas des yaourts brassés par exemple) ;

- *Activité antimicrobienne* : certains ferments sont capables de produire des bactériocines ou d'autres inhibiteurs de micro-organismes indésirables. Ces molécules sont particulièrement intéressantes pour l'élaboration de produits à partir de lait cru, donc susceptibles de contenir des micro-organismes indésirables, voire pathogènes ;

- *Post-acidification* : le choix de souches faiblement post-acidifiantes permet, lors de la fabrication des laits fermentés, de limiter les phénomènes d'acidification qui peuvent intervenir lors de leur stockage à basse température (4 à 6°C), modifiant ainsi leur qualité organoleptique. La sélection d'un ferment fait généralement appel à plusieurs de ces propriétés simultanément (**Corrieu et Luquet, 2008**).

II.3.3. Performances

La sélection d'un ferment lactique doit prendre en compte des critères de performance des bactéries. Ainsi, quelle que soit la (ou les) propriétés fonctionnelles retenues, les bactéries devront répondre à certaines des spécificités suivantes :

- Résistance aux bactériophages (assortie d'un programme de rotation des cultures) ;
- Tolérance aux inhibiteurs de la croissance, tels que les antibiotiques ;
- Résistance aux traitements mécaniques (centrifugation, ultrafiltration) ;
- Aptitude à la congélation ou à la lyophilisation ;
- Aptitude à la conservation (congelée ou lyophilisée) pendant plusieurs mois ;
- Comportement en présence d'oxygène ;
- Tolérance au chlorure de sodium (pour les productions fromagères) ;
- Tolérance au saccharose (cas des laits fermentés sucrés) ;
- Tolérance à l'acidité ;
- Croissance à des températures non optimales (pour certaines fabrications fromagères).
- Tolérance aux températures élevées (fabrications fromagères thermophiles) ;
- Compatibilité avec d'autres souches ;
- Facilité d'emploi.

Les cinq premiers critères de performance concernent toutes les bactéries lactiques, quelles que soient leurs applications, et sont recherchés dès la production des ferments. En revanche, les critères

suivants concernent plutôt leurs utilisations potentielles et sont donc plus variables (**Corrieu et Luquet, 2008**).

II.3.4. Propriétés probiotiques

Lors de la sélection des ferments probiotiques, outre les caractéristiques précédentes, il faut prendre en compte certaines spécificités liées à leur activité probiotique. Ces spécificités correspondent essentiellement à des propriétés de résistance lors du passage dans l'estomac, dans le duodénum et dans l'intestin (**Wildman, 2007; Remacle et Reusens, 2004**). Les probioiques possèdent d'énormes bienfaits sur la santé (**Mattila-Sandholm et Saarela, 2003; Hofman et Thonart, 2002**). Beaucoup de travaux ont discuté les bienfaits des probiotiques sur la santé (**Smith et Charter, 2010; Nollet et Toldrá, 2010; Trivedi, 2009; Gibson et Williams, 2000**). Selon **Drouault et Corthier (2001)**, les principales propriétés recherchées sont les suivantes :

- Résistance aux acides (acides gastriques) ;
- Résistance aux sels biliaires ;
- Stabilité en milieu acide ;
- Aptitude à adhérer aux parois intestinales (adhésion *in vitro* aux cellules épithéliales) ;
- Production de substances antimicrobiennes (bactériocines) ;
- Activité immunostimulante ;
- Activité antioxydante.

II.3.5. Aspects relatifs aux mélanges de souches/espèces

Lorsque le ferment est composé d'un mélange de plusieurs bactéries, il est nécessaire de s'assurer tout d'abord de la compatibilité entre les souches associées. Il s'agit notamment de considérer leur température de croissance, leur activité antimicrobienne (par de production de molécules inhibitrices envers les souches associées) et les interactions bactériennes éventuelles. Les critères qui président à l'élaboration des mélanges de ferments reposent sur la connaissance des propriétés décrites précédemment, en fonction du type de produit à fabriquer. Par exemple, pour l'élaboration d'un yaourt brassé, il s'agira de choisir des souches de bactéries capables d'acidifier rapidement le lait, de produire des exopolysaccharides pour améliorer la texture finale du produit, et de postacidifier faiblement le produit lors de sa conservation (**Luquet et Corrieu, 2008; Salminen *et al.*, 2004**).

II.4. Problèmes liés à l'utilisation des ferments lactiques

Le nombre limité de souches disponibles ayant une haute performance technologique et le risque constant des attaques de bactériophages justifient le besoin continu de rechercher des nouvelles souches pour diversifier la gamme des produits laitiers (**Parente et Cogan, 2004**). L'utilisation des ferments industriels a réduit la diversité des produits laitiers fermentés. Ce phénomène peut être expliqué par le fait que la disponibilité commerciale de nouveaux ferments intéressants est limitée. Actuellement, des efforts sont fournis pour rechercher des nouveaux micro-organismes à partir de lait cru, des cultures non définies, ou des fromages traditionnels, qui démontreraient du potentiel pour être utilisés comme ferments (**Mozzi et al., 2010; Yıldız, 2010**).

La biotechnologie moderne a permis aux chercheurs de développer une meilleure appréciation des risques liés à l'utilisation des ferments lactiques dans l'alimentation humaine. Parmi les problèmes émergents dans l'industrie laitière nous citons:

- *Le risque d'épuisement des souches performantes* : les *starters* commerciaux utilisés dans l'industrie fromagère par exemple sont normalement issus des souches qui n'ont pas été isolées dans le secteur géographique où les fromages sont produits (**Marino et al., 2003**). Cependant, il y a beaucoup d'études qui visent à remplacer des *starters* naturels par des souches de multi cultures définies qui incluent des souches choisies isolées à partir d'endroits géographiques spécifiques. Ces études ont été exécutés en Italie (**De Angelis et al. 2008; de Candia et al., 2007; Pisano et al., 2007; Randazzo et al., 2006**), en Espagne (**Menéndez et al., 2000**), au Portugal (**Macedo et al., 2004**), et en Argentine (**Candioti et al., 2002**).
- *Les problèmes de production liés aux bactériophages* : la sensibilité aux bactériophages constitue un point critique pour les ferments lactiques. Quand les *starters* sont choisis pour l'usage industriel, beaucoup de stratégies ont été développées, à titre d'exemple : le transfert de plasmides de résistance aux bactériophages vers des ferments afin de les rendre résistantes aux bactériophages (**Garneau et Moineau, 2011; Mozzi et al., 2010**). Plusieurs travaux de recherche récents (**Briggiler et al., 2010; Rodriduez Gonzalez et al., 2010; Hejnowicz et al., 2009; Emond et Moineau, 2007; Sturino et Klaenhammer, 2006**) étudient les systèmes impliqués dans les mécanismes de résistance aux bactériophages basés sur la sélection des souches ou la modification génétique par introduction de gènes de résistance aux comme le système *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR).
- *Le risque d'instabilités génétiques* : L'industrie laitière a pris un essor considérable par la sélection des souches de bactéries lactiques basée sur la capacité de production d'acide lactique, de composés aromatiques, de bactériocines, de production de CO₂ et de résistance aux

phages. Ces caractères technologiques sont souvent codés par des plasmides entraînant donc une instabilité de ces caractères (**Von Mollendorff, 2008; Badis *et al.*, 2005; Hansen, 2002**).

- *La résistance aux antibiotiques* : ceci est un problème sérieux qui a suscité un intérêt croissant dans la communauté scientifique. La capacité des bactéries à développer une résistance naturelle aux agents qui lui sont néfastes est bien établie. Cependant, la résistance aux antibiotiques représente un problème particulièrement préoccupant à cause des implications dangereuses pour la santé publique. Par conséquent, une section détaillée est consacrée à ce problème dans ce mémoire.

II.5. Le génie génétique pour l'amélioration des ferments lactiques

On constate souvent l'instabilité des bactéries lactiques : la perte de certaines de leurs propriétés provoque des perturbations au cours de la fermentation. L'utilisation de bactéries lactiques implique donc des risques. La formation de faux-goûts dans le produit fini et la sensibilité des bactéries aux phages sont d'autres défauts dans le produit fini et la sensibilité des bactéries aux phages sont d'autres défauts qui limitent le nombre de cultures disponibles. Les producteurs de cultures sont ainsi obligés de renouveler sans cesse la gamme de souches et de les modifier. Jusqu'à présent il a fallu de vastes programmes de criblage pour isoler et sélectionner de nouvelles souches utilisables. La biotechnologie moderne offre d'autres possibilités pour mettre au point des souches « faites sur mesure », aux propriétés génétiquement stables et programmées. Les avancées technologiques récentes dans la génétique des bactéries lactiques, particulièrement dans la progression de notre compréhension des processus de base relatifs au transport, au métabolisme et à la régulation génétique de l'utilisation des sucres, la production de bactériocines, et la résistance aux phages ont créé beaucoup d'opportunités pour les techniques d'ingénierie pour appliquer des techniques de génétique pour améliorer les ferments lactiques.

Dans le passé, les souches rapides productrices d'acide lactique et résistantes aux bactériophages ont été obtenues par simple sélection et par techniques de mutations. Cependant la perte de ces caractères par un bon nombre de souches modifiées par mutations ainsi que l'instabilité des caractères recherchés apparemment due à la perte de plasmides ont été constatées. La compréhension des propriétés fonctionnelles de plasmides et des mécanismes d'échange génétique et d'expression des gènes dans les streptocoques lactiques promet de faciliter le clonage des traits désirables dans les ferments lactiques (**Mozziet *al.*, 2010; Yıldız, 2010**). Il est bien établi que les cultures *starters* mésophiles ont des plasmides de tailles diverses et que certains codent pour plusieurs fonctions principales.

II.6. Caractéristiques du marché mondial des ferments lactiques

Les ferments lactiques et probiotiques constituent avec la levure de boulangerie, et à moindre degré l'œnologie, la filière industrielle de production de biomasse microbienne la plus importante. Au niveau mondial elle représente un volume global de production annuelle d'environ 5000 tonnes de ferments concentrés (Corrieu et Luquet, 2008). Le marché de la production industrielle de ferments lactiques est difficile à estimer car il se partage entre des ferments pour ensemencement direct ou semi-direct et des ferments congelés ou lyophilisés. Selon Hansen, en 2002, il représente un chiffre d'affaire mondial annuel compris entre 250 à 350 millions d'Euros, dont environ 60 millions sont réalisés par les ferments probiotiques (Abbott, 2004). C'est en outre, un marché en extension (+ 4 à 6% par an), du fait de l'utilisation toujours croissante de l'ensemencement direct en industrie. Ainsi, si l'ensemencement semi-direct était généralisé, le chiffre d'affaire annuel atteindrait approximativement 700 millions d'Euros. En 2005, le marché européen des ferments lactiques et probiotiques se partage entre plusieurs groupes industriels, dont les principaux sont listés dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Principaux producteurs industriels européens de ferments lactiques et probiotiques (Corrieu et Luquet, 2008)

<i>Producteur industriel</i>	<i>Ville/Pays</i>
Alce-Probiotal	Novarra / Italie
Bioprox	Levallois / France
Chr. Hansen (PAI)	Paris / France
CSK Food Enrichment	Leeuwarden / Pays bas
Centre Sperimentale Del Latte (CSL)	Lodi / Italie
Danisco	Brabrand /Danemark
Degussa - Cargill	Paris la Défence / France
DSM Food specialities	Delft / Pays-bas
FA Gewürzmüller GmbH	Stuttgart / Allemagne
Lallemand	Blagnac / France
Quest International UK Ltd	Olt / Royaume-Uni
Sacco	Come / Italie
Standa Industrie	Caen -France
Valio Ltd	Helsinki / Finlande

Il n'y a pas de données disponibles dans l'industrie laitière concernant la réelle quantité ou les types de cultures *starter* utilisées et/ou produites chaque année (Yildiz, 2010). Cependant, le marché est dominé par quelques entreprises. Le premier producteur mondial de ferments lactiques congelés est l'ex-société danoise Chr. Hansen, qui compte environ 8000 souches dans sa collection. Les productions sont réalisées dans trois usines basées au Danemark, aux États-Unis et en France et représentent environ 40 % des ferments commercialisés pour ensemencement direct. La société Danisco, spécialisée dans les ferments lyophilisés, occupe la deuxième position avec 27 % de parts de marché et

recense 7000 souches de bactéries lactiques. Les usines, situées aux États-Unis, en France, en Allemagne et au Danemark, élaborent des ferments lyophilisés et, dans une moindre proportion, des ferments congelés (**Corrieu et Luquet, 2008**). Enfin, la société DSM se situe en troisième position, avec des formes lyophilisées qui représentent 6 % des parts de marché des ferments pour ensemencement direct. Ses usines sont situées en Australie et aux États-Unis (**Corrieu et Luquet, 2008**).

CHAPITRE III : REGLEMENTATION RELATIVE AUX FERMENTS INDUSTRIELS

III.1. Aperçu des exigences réglementaires

Les bactéries lactiques sont utilisées depuis longtemps dans la transformation et la conservation des aliments. Cet usage prolongé a établi, sans ambiguïté, l'innocuité d'un certain nombre de souches et d'espèces appartenant à un nombre restreint de genres microbiens (**Renault, 2002**). L'exploitation de nouvelles souches, espèces, voire même genres bactériens ayant potentiellement de nouvelles propriétés technologiques ou probiotiques a récemment connu un intérêt croissant. Cet intérêt envers des souches nouvelles a incité à une meilleure prise en compte de la nécessité de valider leur innocuité pour le consommateur (**Corrieu et Luquet, 2005; Renault, 2002**). L'évaluation de l'innocuité des souches utilisées pour l'alimentation humaine est actuellement réévaluée dans de nombreux pays, en particulier dans la Communauté Européenne. Ceci a entraîné dans un intervalle de temps relativement court la production d'un certain nombre de lignes directrices et de recommandations sur la façon de vérifier l'innocuité de ces souches. L'exigence pour plus de données de sécurité peut être traduite dans un contexte industriel par plus de temps, plus d'argent et plus de risques pour développer un nouveau produit. Ceci doit être évidemment soupesé contre les bénéfices technologiques et probiotiques potentiels (**Hansen, 2002; Renault, 2002**).

III.1.1. Union Européenne

Dans le cas de l'Union Européenne, trois considérations majeures sont à prendre en compte en matière de ferments lactiques. Le Tableau 12 résume les règlements qui y sont associés.

Tableau 12: Règlements européens relatifs à l'utilisation de ferments lactiques (Corrieu et Luquet, 2005)

Règlement	Description	Référence
1997/258/CE	Relatif aux nouveaux aliments et nouveaux ingrédients, il s'applique aux aliments et ingrédients alimentaires n'ayant pas été utilisés pour la consommation humaine à un degré significatif dans la Communauté européenne avant le 15 mai 1997. Si le produit proposé se situe dans cette catégorie, alors un important dossier doit être constitué, tel que prévu par la législation correspondante. La ligne directrice correspond aux recommandations du 29 juillet 1997.	CE, 1997
2001/18/CE	Relatif aux organismes génétiquement modifiés et s'applique aux « organismes dont le matériel génétique a été modifié d'une manière qui ne s'effectue pas naturellement par multiplication et/ou par recombinaison naturelle ». Si la souche entre dans cette catégorie, une quantité significative de données de sécurité est requise avant que son innocuité ne soit confirmée.	CE, 2001
Système de «Présomption de Sécurité Qualifiée» (Qualified Presumption of Safety, QPS)	Proposé par le Scientific Comitee for Food. Relatif particulièrement aux souches microbiennes, y compris probiotiques. Ainsi, les micro-organismes avec un long historique d'utilisation et de sécurité sont présumés sans risque. La validation de l'innocuité de telles souches serait restreinte à la vérification de quelques caractéristiques critiques, tels que l'absence de facteurs acquis de résistance aux antibiotiques. Naturellement, les souches sans QPS nécessiteront plus de données de sécurité.	Site SCF, 2003

III.1.1.1. Système de « Présomption de Sécurité Qualifiée »

Bien que seulement à l'état de projet au moment de la rédaction de ce mémoire, cette proposition identifie un certain nombre de conditions générales qui devront être remplies avant que la *Qualified Presumption of Safety* (QPS) puisse être établie :

- **L'identité de la souche/espèce:** Elle doit être établie de façon non ambiguë par les méthodes de biochimie et de biologie moléculaire appropriées. Un document-guide sur l'identification et la taxonomie est actuellement en préparation dans le groupe de travail harmonisation de la surveillance réglementaire en biotechnologie de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). La QPS ne peut pas être appliquée à des espèces récemment découvertes (**Leuschner et al., 2010**).
- **La « familiarité »:** Elle inclut l'expérience pratique de l'utilisation de l'organisme, y compris son historique d'utilisation à certaines fins particulières, ou toute littérature disponible sur la biologie du taxon (souche, espèce, genre). Le but de la démarche est d'apporter la preuve suffisante que le potentiel d'effets indésirables chez l'homme ou sur l'environnement est compris et prévisible. Pour les organismes non communément utilisés dans la production d'aliments ou sans historique significatif d'utilisation, cela implique l'acquisition de données

expérimentales sur la génétique de la souche, sa croissance et les caractéristiques biochimiques dans différentes conditions. Cette démarche devrait fournir suffisamment d'éléments pour le troisième test, celui du potentiel pathogène (**Leuschner et al., 2010; Corrieu et Luquet, 2005; Tamime, 2005; Hansen, 2002; Adams, 1999**).

- **La pathogénicité** : Si le groupe taxonomique considéré est communément responsable de pathologies, alors la QPS ne peut s'appliquer. Cependant, si la pathogénicité est limitée à certaines souches et si le mécanisme de pathogénicité est compris et testable, alors le taxon considéré peut encore être éligible pour le statut QPS, les qualifications rattachées excluant alors les souches pathogènes (**Tamime, 2005 ; Adams, 1999**).
- **L'impact environnemental**: Les organismes ayant pour origine le système digestif sain ou régulièrement introduits dans l'environnement ou encore d'origine tellurique ou aquatique sont exemple ce critère (**Adams, 1999**).
- **L'utilisation finale**: Elle influence la nature et le degré de familiarité nécessaires pour déterminer si le statut de QPS est applicable, selon trois catégories :
 - Un organisme vivant, ingrédient d'un produit fini devant entrer directement dans la chaîne alimentaire ;
 - Un organisme vivant, ingrédient d'un produit fini mais ne devant pas entrer directement dans la chaîne alimentaire, bien qu'il puisse y entrer de manière fortuite (un produit de protection des plantes, par exemple) ;
 - Un organisme vivant utilisé comme souche de production, le produit fini étant exempt d'organismes vivants et ne contenant que les produits de fermentation (**Leuschner et al., 2010; Adams, 1999**).

Dans le cas des bactéries lactiques, le statut QPS peut être raisonnablement considéré, comme par exemple pour le genre *Lactobacillus* (**Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN), 2003**). Le SCAN considère que pour les bactéries lactiques utilisées en industrie laitière, le seul critère spécifique serait la démonstration de l'absence de facteurs acquis de résistance aux antibiotiques (**SCAN, 2003**).

III.1.2. USA

Aux Etats-Unis d'Amérique, tous les ingrédients alimentaires sont soumis à l'approbation de la Food and Drug Administration (FDA), à moins de bénéficier du statut GRAS (*generally recognized as safe*) (**FDA, 2003**). Le système GRAS a été introduit en 1958, accompagné alors d'une liste d'ingrédients déjà utilisés et reconnus comme sans danger. En ce qui concerne l'utilisation de bactéries

vivantes dans la préparation d'aliments, très peu ont actuellement ce statut GRAS. Pour les applications laitières, ce statut est limité aux domaines suivants :

- le lait acidifié avec ou sans addition de micro-organismes contribuant aux caractéristiques organoleptiques du produit ;
- le yaourt fabriqué avec *Sc. thermophilus* et *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* ;
- le *Cheddar*, soumis à l'action d'enzymes coagulantes et d'une culture de bactéries produisant de l'acide lactique ;
- certains produits panifiés contenant des bactéries produisant de l'acide lactique, tel que par exemple le « *sour bread* » ;
- *Lb. acidophilus* en tant qu'ingrédient facultatif ;
- *B. lactis* Bbl2 et *Sc. thermophilus* Th4, en tant qu'ingrédients de préparation à base de lait pour nourrissons de quatre mois et plus.

De nombreux industriels disposent de dossiers «Self GRAS» regroupant tous les éléments nécessaires en cas de contrôle (Delorme, 2008 ; Corrieu et Luquet, 2005 ; Renault, 2002).

III.1.3. Associations professionnelles

La Fédération Internationale Laitière (FIL) a eu une approche assez similaire à celle des États-Unis. Ainsi, la FIL a émis une liste de micro-organismes avec un historique d'utilisation alimentaire dans l'Union Européenne, proposée conjointement avec l'European Food and Feed Cultures Association (EFFCA) (Mogensen *et al.*, 2002). Les souches présentes dans cet inventaire ont été commercialisées par une ou plusieurs sociétés membres de l'EFFCA et ont été utilisées à un niveau significatif (défini comme l'équivalent de 10 kg de culture lyophilisée, soit environ 100 tonnes de produit fermenté inoculé à 0,01 %) (Hansen, 2002).

III.1.4. Algérie

Les textes réglementaires algériens contenus dans le journal officiel de la république algérienne, relatifs au lait et dérivés laitiers, touchent surtout aux aspects relatifs au contrôle de la qualité hygiénique et sanitaire de ces aliments. Actuellement, il n'y a aucune législation algérienne qui spécifie les conditions d'utilisation des ferments lactiques importés, les obligations concernant l'étiquetage et/ ou la composition en souches lactiques.

CHAPITRE IV : RESISTANCE DES BACTERIES LACTIQUES AUX ANTIBIOTIQUES

L'évolution rapide de la résistance aux antibiotiques est une réponse des bactéries au changement dramatique de leur environnement présenté par l'utilisation étendue d'antibiotiques. Ceci a abouti à l'émergence de la résistance bactérienne à de nombreux antibiotiques couramment utilisés (voir Figure 8). Ce problème intéresse de plus en plus les chercheurs, vu ses répercussions sur la santé humaine (Nollet et Toldra, 2010). Des mesures correctives sont prises dans plusieurs pays, l'exemple est donné par l'Union Européenne où plusieurs pays ont adopté des programmes pour surveiller cette résistance. Cette approche a été réalisée uniquement dans quelques pays tels que: le Danemark (DANMAP), la Suède (SVARM / SWEDRES), la Finlande (FINRES), la Hollande (MARAN) et la Norvège (NORM / NORM-VET) (EFSA, 2008). Plusieurs travaux de recherches se focalisent sur l'identification des séquences génétiques codant la résistance aux antibiotiques (Hummel *et al.*, 2006). Dans un effort de diminuer le développement de la résistance, de diverses mesures ont été prises au niveau du SCAN pour définir les critères évaluant la présence ou l'absence des causes déterminantes de résistance aux antibiotiques dans les micro-organismes utilisés en tant qu'additifs alimentaires (SCAN, 2003).

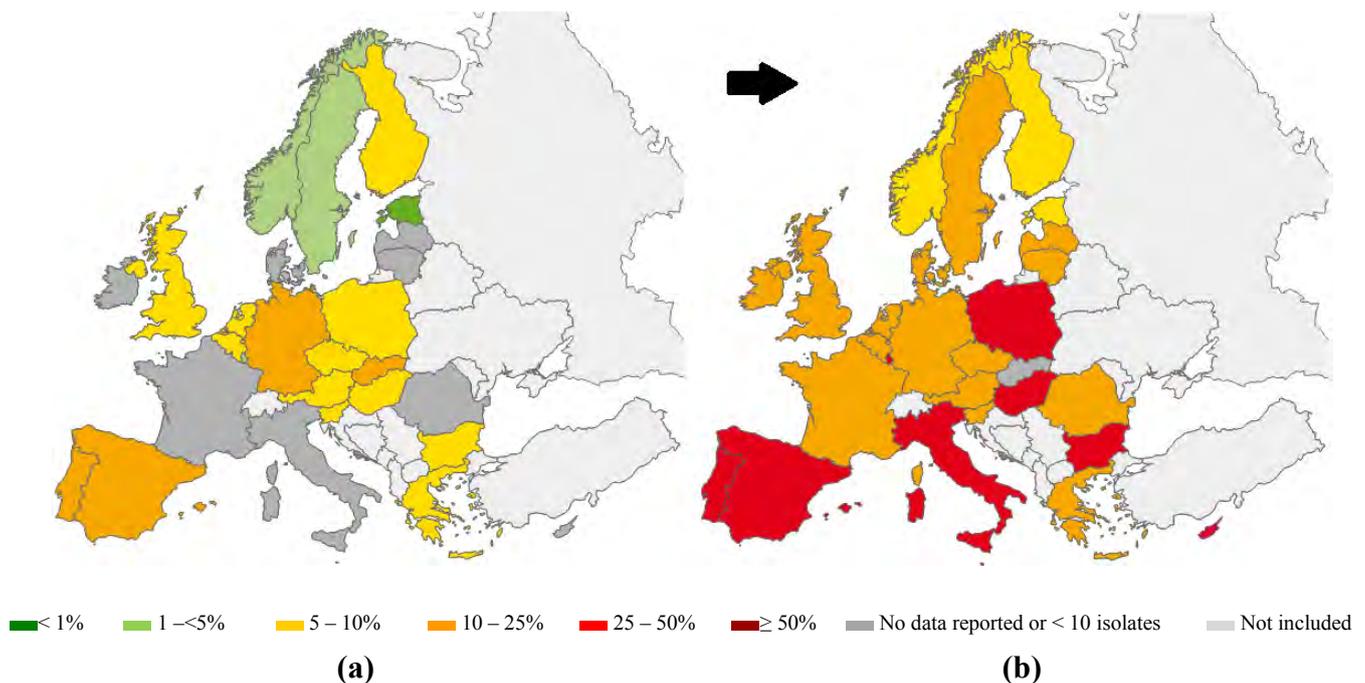


Figure 8: Evolution de la résistance de *E. coli* aux Fluoroquinolones dans différents pays européens : (a) 2001 et (b) 2010. Les pourcentages expriment les proportions des isolats ayant démontré une résistance.

[Les données représentent les soumissions à la base de données du The European Surveillance System (TESSy) jusqu'au 18 août, 2012 à 17:00]⁽¹⁾.

⁽¹⁾ http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/database/Pages/map_reports.aspx

IV.1. Définitions de la résistance aux antibiotiques

Plusieurs types de résistance aux antibiotiques existent chez les bactéries, le Tableau 13 explique brièvement la nature de chacune de ces résistances (Lavigne, 2010):

Tableau 13 : Différents types de résistance des bactéries aux antibiotiques

1. Résistance innée	Nommée également résistance intrinsèque ou naturelle ; cette résistance concerne toutes les souches d'une espèce donnée. On rencontre ce type de résistance chez les souches sauvages, n'ayant jamais été en contact avec un antibiotique. Elle permet de définir le spectre clinique d'un antibiotique.
2. Résistance acquise	Quand une souche d'une espèce typique susceptible devient résistante à un antibiotique donné on la considère donc comme résistance acquise.
3. Résistance clinique	C'est l'expression de la résistance in vivo par l'échec thérapeutique.
4. Résistance croisée	Fait référence au spectre d'inactivation lié à un même mécanisme de résistance vis-à-vis de divers antibiotiques appartenant à la même famille ou sous-groupe (se révèle par lecture interprétative de l'antibiogramme).
5. Résistance chromosomique (liée au chromosome)	Il s'agit souvent d'expliquer le déterminisme génétique d'une résistance naturelle ou acquise dont le ou les gènes est ou sont liés au chromosome (mutation).
6. Résistance génétique	Modification du patrimoine génétique entraînant des augmentations limitées de concentration minimale inhibitrice (CMI), souvent peu apparente de légères modifications du patrimoine génétique d'une bactérie peuvent entraîner une moindre sensibilité à un antibiotique ou plusieurs de la même famille ou de plusieurs selon le mécanisme.
7. Résistance extrachromosomique (plasmidique)	La résistance est liée à la présence d'un fragment d'ADN, le plus souvent en position cytoplasmique et non chromosomique tel un ADN plasmidique révélé après une électrophorèse sur gel.
8. Résistance associée	Résistance médiée par un plasmide porteur de plusieurs gènes de résistance à des antibiotiques de familles différentes (résistance plasmidique ou transposable)
9. Résistance inductible	Expression de la résistance en présence d'un inducteur (antibiotique de la même famille).
10. Résistance constitutive (déreprimée)	Modification de l'ADN d'un gène impliqué dans la résistance inductible, se traduit par une expression augmentée de la résistance
11. Résistance transposable	Structure particulière d'ADN localisée sur des transposons (éléments génétiques mobiles), situés soit dans le chromosome, soit sur un plasmide.

IV.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

IV.2.1. Mécanismes biochimiques

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques en se rendant imperméables à leur pénétration, en produisant des enzymes capables de les inactiver ou en modifiant la structure de leurs cibles. Les mécanismes biochimiques impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques sont brièvement expliqués ci-dessous (EFSA, 2008; SCAN, 2003).

IV.2.1.1. Interférence avec le mécanisme de transport de type imperméabilité : Défaut d'entrée de l'antibiotique dans la bactérie (Gram -) provoqué par le dysfonctionnement ou la perte d'une porine qui sont des canaux aqueux ou hydrophiles constitués de trois molécules de protéines qui laissent diffuser diverses molécules de faible masse moléculaire comme des substrats ou encore des antibiotiques. *Exemple*: β -lactamines.

IV.2.1.2. Interférence avec le mécanisme de transport de type efflux : Extrusion de l'antibiotique de la bactérie (Gram + ou Gram -). *Exemple*: Quinolones.

IV.2.1.3. Inactivation ou détoxification enzymatique : Le mécanisme de résistance naturelle ou acquise par inactivation ou détoxification enzymatique est important et très varié. *Exemple*: les β -lactamases (au moins 350 enzymes maintenant identifiées). La résistance par ce type de mécanisme à d'autres familles d'antibiotiques est bien connue comme pour les aminoglycosides avec les enzymes impliqués.

IV.2.1.4. Modification d'affinité de la cible : Ce mécanisme est en relation avec une modification d'affinité d'une ou plusieurs cibles de type PLP (Protéines de liaison aux pénicillines) ou PBP (*Penicillin Binding Protein*) comme chez *Streptococcus pneumoniae* définissant une résistance de niveau variable: bas niveau de résistance (BNR) et haut niveau de résistance (HNR).

IV.2.1.5. Substitution de cible : Ce mécanisme est de moindre importance dans le monde bactérien. Cependant, l'exemple majeur est la résistance intrinsèque de *Staphylococcus aureus* qui est liée d'une part, à la présence d'une nouvelle PLP de faible affinité, dénommée PLP2a et d'autre part à son hyperproduction. La conséquence clinique est importante, car il y aura résistance croisée entre β -lactamines.

IV.2.2. Mécanismes génétiques

IV.2.2.1. Mutation

Les mutations chromosomiques peuvent conduire à une résistance accrue aux antibiotiques de différentes manières. Les plus fréquents sont des mutations dans les gènes codant pour les molécules cibles d'antibiotiques, généralement par une modification sur le site de liaison de l'antibiotique. Un exemple bien étudié est celui des mutations dans le gène de la protéine de liaison de la pénicilline ce qui se traduit par une résistance élevée à la pénicilline. Des mutations de l'ARNr 16S ou 23S rend *Helicobacter pylori* et *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la tétracycline et l'érythromycine, respectivement. La résistance par mutation des gènes chromosomiques présente un faible risque de diffusion horizontale toutefois (EFSA, 2008).

IV.2.2.2. Acquisition d'ADN

Trois principaux mécanismes de résistance antimicrobienne ont été décrits: (i) l'inactivation directe de la molécule active, (ii) la perte de susceptibilité bactérienne à l'antibiotique par la modification de la cible d'action et (iii) de réduction de la concentration de l'antibiotique qui atteint la molécule de cible sans modification du composé elle-même (SCAN, 2003). Les mécanismes de défense d'antibiotiques de la résistance intrinsèque est dans la plupart des cas relative à la présence de basses cibles d'affinité, l'absence de cibles, prise diminuée ou flux d'antibiotiques (Figure 9).

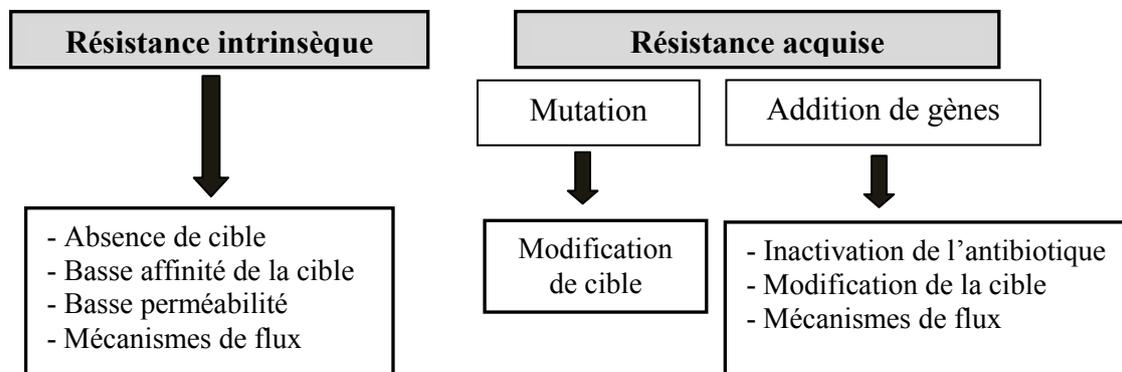


Figure 9 : Principaux mécanismes de résistance intrinsèque et acquise aux antibiotiques (EFSA, 2008)

IV.3. Familles des antibiotiques

Les principales sources des antibiotiques sont les champignons comme la pénicilline qui est produite par le champignon *Penicillium*, mais ils peuvent aussi avoir comme source les bactéries. Il existe également des antibiotiques entièrement synthétiques comme le chloramphénicol, produit de synthèse chimique (Guillemot *et al.*, 2006; Yala *et al.*, 2001). Les antibiotiques sont définis aussi par leur :

- Activité antibactérienne (spectre d'activité) ;

- Toxicité sélective (mode d'action) et
- Bonne absorption et diffusion dans l'organisme (pharmaco-cinétique) (Yala *et al.*, 2001).

Les antibiotiques sont aussi subdivisés en plusieurs familles selon leur spectre d'action (voir Tableau 14).

Tableau 14: Principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité (Abidi, 2004)

Familles	Antibiotiques correspondants	Spectre d'activité
Bêtalactamines <i>Les pénicillines</i>	Pénicilline G ; Pipéracilline ; Ampicillines ; Nafcilline ; Amoxicilline ; Oxacilline ; Carbénicilline ; Cloxacilline ; Dicloxacilline	Coques Gram + et Gram - Bacilles Gram +
<i>Les céphalosporines</i>	Première génération Céfalexine ; Céfazoline ; Cefalonium ; Céfadroxil ; Céfapirine ; Céfalotine ; Céfhradine Deuxième génération Céfuroxime ; Céfoxitine Troisième génération Ceftiofur ; Céfépime ; Céfopérazone ; Ceftazidime ; Céfotiam Quatrième génération Cefquinome	Gram + Spectre intermédiaire Gram -
Aminosides	Streptomycine ; Paramomycine ; Néomycine ; Framycétine ; Apramycine ; Tobramycine ; Amikacine ; Spectinomycine ; Gentamicine ; Ribostamycine ; Kanamycine ; Netilmicine	Bacilles Gram -
Phénicolés	Chloramphénicol ; Florfénicol ; Thiamphénicol	Spectre large
Tétracyclines	Oxytétracycline ; Minocycline ; Chlortétracycline ; Doxycycline ; Déméthylchlortétracycline	Spectre large
Macrolides	Érythromycine ; Tilmicosine ; Lincomycine ; Spiramycine ; Josamycine ; Oléandomycine ; Tulathromycine ; Tylosine	Coques Gram + et Gram - Bacilles Gram + Mycoplasmes
Glycopeptides	Vancomycine ; Teicoplanine	Bactéries Gram +
Polypeptides	Colistine ; Tyrothricine ; Colistiméthate ; Bacitracine ; Polymyxine B	Bacilles Gram -
Sulfamides	Sulfaméthizol ; Sulfathiazol ; Sulfadimidine ; Sulfadimérazine ; Sulfaméthoxazole ; Sulfadiazine ; Sulfadiméthoxine ; Sulfaméthoxypyridazines	Spectre large
Quinolones	Acide oxolinique ; Fluméquine ; Ciproflaxine ; Ibafloracine ; Marbofloracine ; Difloxacinédge Enrofloxaciné ; Danofloxaciné	Spectre large

IV.4. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques exercent leur action sur les cellules procaryotes au niveau de différentes cibles.

IV.4.1. Synthèse de la paroi :

Certains antibiotiques interfèrent avec, ou se fixent sur une enzyme de la voie de biosynthèse du peptidoglycane et bloquent son activité. De plus, d'autres mécanismes peuvent être mis en jeu (**Jean-Noel et Guy, 2006**). Les antibiotiques en question sont principalement des β -Lactamines (pénicillines, céphalosporines, et dérivés), Cyclosérine, Bacitracine, Vancomycine et Fosfomycine (**Abidi, 2004**).

IV.4.2. Réplication (synthèse de l'ADN) :

Les quinolones bloquent l'ADN gyrase, provoquant une fragmentation de l'ADN. La Novobiocine empêche la fixation de l'ATP sur l'ADN gyrase (**Jean-Noel et Guy, 2006**).

IV.4.3. Transcription (synthèse des ARN) :

La Rifampicine se fixe sur la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendante altérant ainsi le message (**Abidi, 2004**).

IV.4.4. Traduction (synthèse des protéines):

La Streptomycine se fixe sur l'ARN 16 S de la sous unité 30 S du ribosome et empêche l'initiation. D'autres aminosides se fixent sur l'ARN 16 S de la sous-unité 30 S du ribosome et empêchent l'élongation. L'Erythromycine se fixe sur la sous unité 50 S du ribosome et bloque la translocation (**Jean-Noel et Guy, 2006**).

IV.5. Problèmes liés à l'utilisation des antibiotiques

Les problèmes liés à la présence des résidus d'antibiotiques dans le lait sont à la fois d'ordre sanitaire et technologique. Il faut toutefois distinguer la notion d'inhibiteurs qui correspond à un problème technologique et la notion de résidus qui correspond à un problème de santé publique (**Fabre et al., 2002**).

IV.5.1. Les problèmes sanitaires

- (i) **Problèmes d'allergie:** En médecine humaine, l'allergie est un effet secondaire reconnu des antibiotiques et en particuliers des bêta-lactames (**Fabre et al., 2006; Châtaigner et Stevens, 2005**). Des cas d'allergies aux résidus de pénicilline dans les aliments d'origine animale ont été scientifiquement prouvés, ceux-ci restent extrêmement rares. Quelques cas

seulement d'allergie à la pénicilline, suite à la consommation des produits laitiers, ont été déclarés dans le monde en plusieurs décennies (**Federicci-Mathieu, 2000**).

- (ii) **Risques toxiques:** La toxicité directe des antibiotiques est dans l'ensemble extrêmement limitée. Le cas de toxicité potentielle fréquemment cité est celui du chloramphénicol, qui a été responsable d'anémies aplasiques chez l'homme (liées à son utilisation en médecine humaine) (**Fabre et al., 2006; Châtaigner et Stevens, 2005**). L'utilisation vétérinaire de cette molécule est désormais interdite pratiquement partout dans le monde (**Fabre et al., 2006; Maghuin-Rogister et al., 2001**).
- (iii) **Modifications de la flore digestive du consommateur:** Dans le tube digestif vivent des milliards de bactéries saprophytes et commensales. La consommation de produits contenant des résidus d'antibiotiques (cyclines, sulfamides) perturbe cette flore intestinale (**Châtaigner et Stevens, 2005**). En modifiant sa composition par inhibition sélective, ils dévastent la flore normale et laissent place à d'autres espèces (**Abidi, 2004**) et diminuent ainsi l'immunité naturelle préétablie. Ceci peut entraîner une atteinte du système nerveux, des os, des dents, du foie, du sang ainsi que l'apparition de bactéries mutantes résistantes aux antibiotiques, engendrant des échecs thérapeutiques (**Broutin et al., 2005**).
- (iv) **Risques d'antibiorésistance:** Au cours des deux dernières décennies, les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont devenus un sérieux problème de santé publique. Une des raisons de l'augmentation de cette résistance pourrait résider dans l'utilisation préventive et thérapeutique d'antibiotiques en production animale, car les médicaments vétérinaires contiennent en partie les mêmes matières actives qu'en médecine humaine (**Gysi, 2006**).

IV.5.2. Les problèmes technologiques

Les résidus d'antibiotiques représentent un réel problème pour les transformateurs laitiers par leurs conséquences néfastes sur les fermentations lactiques et constituent le problème majeur des accidents de fabrication (**d'Aimmo et al., 2007**). La présence de résidus d'antibiotiques inhibe de manière partielle ou totale la croissance des ferments et se traduit par de nombreux accidents de fabrication tels que les défauts de coagulation du lait, l'insuffisance de l'égouttage et les risques de prolifération incontrôlée de germes gazogènes, insensibles aux antibiotiques telles que les coliformes, *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Aerobacter* ce qui rend le lait contenant des résidus d'antibiotiques inapte à la transformation (**Abidi, 2004; Stoltz et Hankinson, 1952**). Dans la plupart des pays, la

législation interdit la vente de lait contenant des antibiotiques tel que recommandé par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Kelly, 2009; d'Aimmo *et al.*, 2007).

IV.6. Pertinence de la résistance aux antibiotiques aux ferments lactiques

Pendant plusieurs décennies d'études sur la sélection et la diffusion de la résistance aux antibiotiques, de nombreux chercheurs ont émis récemment l'hypothèse que les bactéries commensales, y compris les bactéries lactiques peuvent servir de réservoirs de gènes de résistance aux antibiotiques semblables à ceux trouvés dans les pathogènes humains. Beaucoup d'antibiotiques sont utilisés dans la production laitière pour traiter les mammites, et ils sont excrétés dans le lait des vaches traitées. Depuis les années 1950 et le milieu des années 1970, il y avait des rapports concernant la présence d'antibiotiques dans le lait. Des essais ont été réalisés afin d'accroître la résistance aux antibiotiques des cultures de lactobacilles utilisées pour la production du yaourt (Sozzi et Smiley, 1980; Stoltz et Hankinson, 1952). Les bactéries résistantes sont potentiellement transmissibles à l'homme via les denrées alimentaires (Fabre *et al.*, 2006; Châtaigner et Stevens, 2005). La principale menace associée à ces bactéries, c'est qu'elles peuvent transférer des gènes de résistance aux bactéries pathogènes voyant que le tractus gastro-intestinal est un environnement idéal pour le transfert de gènes entre les bactéries de différents types (Kelly, 2009).

Un certain nombre d'initiatives ont été récemment lancées par diverses organisations à travers le monde pour répondre aux préoccupations en matière de biosécurité des cultures *starter* et les micro-organismes probiotiques (Kelly, 2009; d'Aimmo *et al.*, 2007). Les études peuvent conduire à une meilleure compréhension du rôle joué par les cultures *starters* dans le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques à la flore intestinale humaine et aux bactéries pathogènes probablement ingérés avec l'alimentation (Mathur et Singh, 2005).

Il est important de préciser que la problématique de l'antibiorésistance doit être différenciée de celle des résidus d'antibiotiques. Ceux-ci peuvent avoir des répercussions sur la santé des consommateurs (*ex.* allergies) mais ne sont pas en cause dans le développement de l'antibiorésistance. Par ailleurs, il faut souligner que ce ne sont pas les animaux où les humains qui deviennent résistants aux antibiotiques mais bien les bactéries qui les affectent (Fabre *et al.*, 2006 ; Châtaigner et Stevens, 2005).

Matériels & Méthodes

Les analyses de contrôle de la qualité microbiologique, l'isolement et les différents tests de caractérisation des ferments lactiques ont été réalisés au niveau du Laboratoire d'hygiène du Service d'épidémiologie et de médecine préventive (SEMEP) de Sedrata, wilaya de Souk Ahras du 19/04/2011 - 02/09/2011.

L'étude de susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques a été réalisée au Laboratoire de microbiologie à l'Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro-Alimentaires (INATAA), Université Mentouri de Constantine dans la période s'écoulant du 23/04/2012 au 06/06/2012. La mesure de l'absorbance a été effectuée au Laboratoire de physico-chimie.

I) MATÉRIEL

I.1. Matériel biologique

Dans cette étude, nous avons utilisé cinq échantillons de ferments industriels lyophilisés pour ensemencement direct (DVS) (Annexe 1). Ces ferments nous ont été fournis par :

SARL Hodna lait



(M'sila)

SARL Safilait



(Constantine)

SNC IGILAIT



(Jijel)

Les ferments lactiques lyophilisés pour ensemencement direct du lait sont commercialisés généralement dans des sachets en aluminium imperméables à l'eau et à l'air. Les ferments peuvent se conserver douze mois à +4°C et jusqu'à dix-huit mois à -18°C si la chaîne de froid est correctement appliquée. Nous avons pris les mesures nécessaires pour transporter les ferments au laboratoire en respectant la chaîne de froid en transportant les échantillons de ferments fournis dans une glacière.

Les ferments analysés sont décrits dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Description des ferments lactiques lyophilisés étudiés

Fabricant	Appellation commerciale	Description
Sacco	Lyofast Y 456 B	Ferment pour yaourt Mélange de souches de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> pour ensemencement direct (DVS) fourni par l'unité dans son emballage initial (voir Annexe 1), contenant 50 Unités sous forme lyophilisée.
Chr. Hansen	YC-180 Yo-Flex®	Ferment pour yaourt Mélange de souches aromatiques thermophiles pour ensemencement direct (DVS) fourni par l'unité dans son emballage initial (voir Annexe 1), contenant 10 Unités sous forme lyophilisée.
Chr. Hansen	CHN-11	Ferment pour fromage Culture mixte de souches mésophiles aromatiques et acidifiantes dans un emballage étanche à l'air et à la vapeur d'eau (voir Annexe 1).
Coquard	ALPHA 10	Ferment pour fromage Mélange de cultures mésophiles acidifiantes 2/3 homofermentaires et 1/3 hétérofermentaires fourni dans son emballage initial (petit flacon) (voir Annexe 1).
Hansen	SALSA 1	Ferment pour affinage et aromatisation du fromage Souche pure de <i>Staphylococcus xylosus</i> fournie dans son emballage initial (voir Annexe 1), contenant 10 Unités sous forme lyophilisée.

I.2. Antibiotiques

Les antibiotiques choisis pour notre étude sont prêts à l'emploi sous forme de solutions dans des flacons en verre de 100 ml à usage vétérinaire. Les antibiotiques ont été achetés auprès d'un fournisseur de produits à usage vétérinaires. Ces antibiotiques sont destinés au traitement des vaches laitières atteintes de maladies les plus fréquentes telles que les mammites. Les antibiotiques choisis pour l'étude sont:

- **Pen&Strep** : Association Pénicilline et Streptomycine.
- **Ampicilline** : Ampicilline tri-hydratée.

- **Sulfaprim S** : Association Sulfadiazine et Triméthoprim.

I.3. Milieux de culture, appareils et réactifs:

- Les milieux de culture ainsi que leur composition sont décrits dans l'Annexe 2 ;
- Les matériels et appareillages utilisés dans la présente étude sont cités dans l'Annexe 3 ; et
- Les réactifs chimiques, dans l'Annexe 4.

II) MÉTHODES

Notre étude comprend les volets décrits dans le Tableau 16 :

Tableau 16: Aperçu général des paramètres étudiés et les méthodes adoptées

Paramètres étudiés	Méthodes
Contrôle microbiologique des échantillons de ferments lactiques commerciaux collectés auprès de 3 entreprises algériennes.	Techniques classiques de microbiologie pour la recherche des : - Coliformes totaux et fécaux ; - Streptocoques fécaux ; - <i>Staphylococcus aureus</i> ; - Salmonelle ; - Levures et moisissures ; - Flore totale aérobie mésophile.
Tests de caractérisation de différentes souches présentes dans les ferments lactiques industriels.	- Isolement sur milieux solides ; - Caractérisation morphologique ; - Détermination des caractères physiologiques ; - Caractérisation biochimique.
Évaluation de la susceptibilité des échantillons de ferments collectés à des antibiotiques utilisés dans la médecine vétérinaire.	- Suivi de l'activité acidifiante et la croissance cellulaire par mesure de l'absorbance à différentes concentrations d'antibiotiques et des témoins ; - Dénombrement des témoins des ferments du yaourt à différents intervalles de temps pour estimer l'évolution de la biomasse au cours de la fermentation.
Consultation d'un panel d'experts scientifiques et industriels afin d'évaluer les potentialités de fabrication locale de ferments lactiques autochtones.	Méthode Delphi.

II.1. Contrôle de la qualité microbiologique des ferments

Bien que les ferments lactiques soient fabriqués sous licence de bonnes pratiques de fabrication (BPL) et représentent des produits ayant une qualité microbiologique bien contrôlée, nous avons entrepris de vérifier la qualité microbiologique des échantillons de ferments recueillis dans cette étude pour les raisons suivantes :

- Il n'existe pas d'exigences réglementaires particulières par rapport aux cahiers de charges que doivent respecter les importateurs de ferments ;

- Les échantillons collectés sont fabriqués par différentes sociétés et la qualité du produit fini commercialisé dépend souvent du fabricant.

Nous avons conservé les échantillons de ferments lactiques au congélateur et les avons transportés depuis les unités de productions vers le laboratoire dans une glacière munie de plusieurs poches de glace. Afin de minimiser toute contamination externe risquant d'affecter la qualité hygiénique des ferments, le contrôle de la qualité microbiologique fut réalisé immédiatement après l'ouverture de l'emballage initial.

II.1.1. Réhydratation des ferments

Nous avons réalisé cette étape de réhydratation des ferments afin de favoriser la multiplication des germes (**Gianni de Carvalho et al., 2009**). Nous avons incorporé les ferments lactiques lyophilisés à raison de 1% (correspondant à 1 g/100 ml) dans des tubes à essais préalablement stérilisés contenant du lait écrémé (0% matière grasse) stérilisé à ultra haute température (UHT). Les tubes sont incubés par la suite jusqu'à coagulation totale du lait (à 37°C pendant 24 heures). Nous avons préparé ainsi des lots d'un volume total de 100 ml chacun, correspondant à chacun des cinq échantillons de ferments collectés. Nous avons utilisé par la suite ces solutions de ferments réhydratés (lait fermenté) pour effectuer les différentes analyses microbiologiques selon les protocoles de contrôle de qualité des produits laitiers (**Lebres et al., 2002**). Les résultats sont exprimés par gramme du ferment ainsi réhydraté.

II.1.2. Préparation de la dilution mère

Nous avons introduit 25 g du ferment réhydraté (voir section II.1.1.) aseptiquement dans un bocal stérile préalablement taré contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée stérile. L'homogénéisation a été réalisée sur vortex après introduction de l'aimant stérilisé au préalable dans l'autoclave. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond à la dilution 1/10 ou 10^{-1} (**Lebres et al., 2002**).

II.1.3. Préparation des dilutions décimales

Un millilitre de la dilution mère (10^{-1}) est prélevé aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile et introduit dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau peptonée tamponnée. On obtient ainsi la dilution 10^{-2} et on répète la même procédure en prélevant 1ml à partir de la dilution 10^{-2} et en l'introduisant aseptiquement dans un tube à essai contenant 9 ml du diluant et ainsi de suite (**Arrêté 11 septembre 2004, JORA n° 70 du 7 novembre 2004 ; Guiraud, 2003**). Nous avons préparé ainsi sept dilutions.

II.1.4. Recherche et dénombrement des germes de contamination

On entend par « organismes de contamination » tout micro-organisme autre que ceux responsables de fermentations spécifiques du type de lait fermenté considéré (**Arrêté du 27 mars 2004 publié dans le JORA n° 32 du 23 mai 2004**). Les principaux milieux sélectifs utilisés pour l'isolement et le dénombrement des entérobactéries, des entérocoques, des *Staphylococcus aureus* et des levures/moisissures et de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) sont décrits dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Milieux sélectifs et conditions d'incubation pour recherche des germes de contamination dans les ferments lactiques lyophilisés

Germes recherchés	Milieu de culture utilisé	Conditions d'incubation	
		Température	Temps
Coliformes totaux	BLBVB liquide	37°C	24 à 48 heures
	- Bouillon VBL + cloche de Durham - Eau peptonée exempte d'indole	44°C	24 heures
Streptocoques fécaux	- Bouillon Rothe	37°C	24 à 48 heures
	- Bouillon Eva Litskey	37°C	24 heures
Levures et moisissures	OGA	30°C	5 jours
Staphylocoques	Gélose Chapman	37°C	24 heures
Salmonelles	- Eau peptonée tamponnée	37°C	16 à 20 heures
	- Bouillon sélénite cystine	37°C et 43°C	24 heures
	- Gélose Hektöen	37°C	24 heures
	- Gélose SS	37°C	24 à 48 heures

II.1.4.1. Coliformes

La recherche des coliformes dans les laits fermentés se fait en milieu liquide par technique du Nombre le Plus Probable (NPP) à l'aide du Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLVBL) réparti à raison de 10 ml par tubes munis d'une cloche de Durham. La technique en milieu liquide (**Arrêté du 24 mai 2004 publié dans le JORA n° 43 du 4 juillet 2004**) fait appel à deux tests consécutifs à savoir:

- *Le test de présomption* : réservé à la recherche des Coliformes totaux ;
- *Le test de confirmation* : appelé encore test de Mac Kenzie et réservé à la recherche des Coliformes fécaux à partir des tubes positifs de test de présomption.

Le gaz éventuellement présent dans les cloches de Durham doit être chassé et le milieu et l'inoculum sont bien mélangés avant incubation. Les tubes du bouillon BLVBL trouvés positifs lors du dénombrement des coliformes totaux feront l'objet d'un repiquage à la fois dans:

- Un tube de VBL muni d'une cloche et,
- Un tube d'eau peptonée exempte d'indole (**Arrêté du 24 mai 2004 publié dans le JORA n° 43 du 4 juillet 2004**).

Ont été considérés comme positifs les tubes présentant à la fois :

- Un dégagement gazeux (supérieur au 1/10 de la hauteur de la cloche) ;
- Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune (ce qui constitue le témoin de la fermentation du lactose présent dans le milieu).

Nous avons effectué la lecture finale selon les prescriptions de la table de Mac Grady (Annexe 5).

II.1.4.2. *Streptocoques fécaux*

Dans les laits et produits laitiers, les Streptocoques du groupe D ou Streptocoques fécaux sont recherchés et dénombrés en milieu liquide par technique du NPP. La technique en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- *Le test de présomption* : réservé à la recherche des Streptocoques sur milieu de Rothe ;
- *Le test de confirmation* : réservé à la confirmation proprement dite sur milieu Eva Litsky des tubes trouvés positifs au niveau des tests de présomption.

Chaque tube Rothe trouvé positif lors du test de présomption (présentant un trouble microbien) fera l'objet d'un repiquage dans un tube de milieu Eva Litsky (**Lebres *et al.*, 2002**). Dans le test confirmatif, nous avons considéré comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- Un trouble microbien et ;
- Une pastille blanchâtre ou violette au fond du tube.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady en tenant compte uniquement des tubes d'Eva Litsky positifs.

II.1.4.3. *Salmonelles*

La méthode utilisée pour la recherche des Salmonelles est décrite dans l'Arrêté du 23 janvier 2005 publié dans le **JORA n° 42 du 15 juin 2005**.

Jour 1 : Pré-enrichissement

25 ml de ferment revivifié à analyser sont introduits dans un flacon contenant 225 ml d'eau peptonée tamponnée préalablement stérilisé. La préparation est homogénéisée sur vortex et incubée à 37°C pendant 16 à 20 heures.

Jour 2 : Enrichissement

L'enrichissement proprement dit, se fait à partir du milieu de pré-enrichissement en introduisant 10 ml en double dans des flacons de sélénite cystéiné (l'incubation se fait à 37°C et à 43°C).

Jour 3 : Isolement

Chaque flacon fera l'objet d'un isolement sur deux milieux gélosés différents à savoir : milieu gélosé Hektöen et Gélose SS.

Jour 4 : Lecture des boîtes et identification

Cinq colonies caractéristiques et distinctes feront l'objet d'une identification morphologique et biochimique.

II.1.4.4. *Levures et moisissures*

A partir des dilutions décimales, 10^{-3} à 10^{-1} , quatre gouttes sont portées aseptiquement dans une boîte de Pétri contenant de la gélose glucosée à l'oxytétracycline (OGA). Les gouttes sont étalées à l'aide d'un râteau stérile, puis incubées. Dans le souci de ne pas se trouver en face de boîtes envahies soit par les levures soit par les moisissures, des lectures et des dénombrements sont réalisés tous les jours, levures à part et moisissures à part.

L'opération a été exécutée de la même façon et dans les mêmes conditions, avec le même diluant, c'est-à-dire prendre quatre gouttes du diluant, les étaler avec un râteau à part et les incuber dans le même endroit que les boîtes tests, cette boîte constitue le témoin diluant.

Une boîte du milieu utilisé a été incubée telle quelle, dans le même endroit et dans les mêmes conditions de température, elle constitue le témoin du milieu (**Lebres *et al.*, 2002**).

II.1.4.5. *Staphylocoques à catalase positive*

La recherche de *Staphylococcus aureus* est réalisée sur milieu de Chapman. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48 heures (Lebres *et al.*, 2002).

II.1.4.6. *Bactéries non lactiques*

La flore cultivable est recherchée et dénombrée sur gélose PCA par ensemencement en masse des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} . Les boîtes sont incubées à 30°C, trois lectures sont effectuées à 24, 48 et 72 heures (Lebres *et al.*, 2002).

II.2. Caractérisation des ferments commerciaux

II.2.1. Revivification

Nous avons incorporé les ferments lactiques lyophilisés à raison de 1% dans des tubes à essais stériles contenant du lait UHT écrémé (0% matière grasse) additionné de 10g/l d'extrait de levure et de 20 g/l de glucose (Gianni de Carvalho *et al.*, 2009). Le mélange du lait UHT, de glucose et d'extrait de levure est stérilisé à 120°C pendant 15 minutes dans l'autoclave avant incorporation des ferments. Ces tubes seront incubés après inoculation jusqu'à coagulation du lait (à 37°C pendant 24 heures).

Après revivification des ferments lyophilisés, un ensemble de dilutions (10^{-4} - 10^{-7}) est préparé dans de l'eau peptonée tamponnée afin d'obtenir une meilleure culture non encombrée sur milieux gélosés, ce qui permettra par la suite un bon isolement des différentes souches à partir des cultures mixtes.

II.2.2. Isolement et purification sur milieux solides

Des boîtes de Pétri contenant les géloses MRS pour les lactobacilles et l'agar M17 pour les coques lactiques, sont ensemencées par étalement à l'aide d'un râteau stérile de 1 ml de dilution désirée (10^{-4} à 10^{-7}). L'incubation des boîtes contenant les géloses M17 et MRS est réalisée à une température de 37°C pour les ferments du yaourt et à 30°C pour les ferments du fromage. Pour les ferments du yaourt, le pH du milieu MRS a été ajusté à 5,4 pour favoriser la multiplication des lactobacilles. L'incubation est réalisée pendant 24 et 48 heures pour les lactocoques et pendant 48 à 72 heures pour les lactobacilles. On obtient des colonies distinctes qui vont servir par la suite à effectuer les différentes étapes d'isolement et de repiquage des souches lactiques afin de les identifier.

La purification des souches isolées est réalisée par repiquages successifs sur milieux sélectifs. Nous avons utilisé une loupe binoculaire pour inspecter et décrire l'aspect exact des colonies sur les milieux de culture ainsi qu'un microscope optique pour vérifier la pureté des souches. La pureté des

souches est révélée par des colonies homogènes ayant le même aspect extérieur (couleur, taille et forme) (**Guiraud, 2003**).

II.2.3. Préservation des échantillons à basse température

Après avoir isolé et purifié les bactéries lactiques à partir de l'échantillon des mélanges non caractérisés de ferments lyophilisés, nous avons entrepris de les préserver de toute condition dénaturante et de les garder en bon état afin de garantir une viabilité maximale des cellules pour toute utilisation ultérieure. Nous avons utilisé les méthodes de conservation suivantes :

II.2.3.1. Par réfrigération

La conservation à court terme des souches pures a été réalisée sur milieu solide incliné. Après croissance à la température optimale, les cultures sont maintenues à 4°C et le renouvellement des souches se fait par repiquage toutes les 4 semaines (**Guiraud, 2003**).

II.2.3.2. Par congélation

La conservation à long terme des isolats purifiés est réalisée à une température de -20°C dans un milieu contenant 70% de lait écrémé (enrichi par 0,05 % d'extrait de levure et 0,05 % de glucose) et 30% de glycérol. Le milieu est stérilisé au préalable par autoclavage pour 15 minutes à 121°C (**Guiraud, 2003**).

II.2.4. Détermination de la morphologie

Afin de vérifier les caractères morphologiques de nos souches (Gram, type d'association), nous avons effectué une étude macroscopique et microscopique avec coloration de Gram. Afin de déterminer leurs caractères culturels (couleur, disposition, forme et aspect), les colonies obtenues sont observées à la loupe binoculaire. L'observation macroscopique est réalisée dans le but d'observer la disposition, la couleur et l'aspect des colonies sur boîtes de Pétri (**Guiraud, 2003**). Après la coloration de Gram, les cellules sont examinées au microscope optique (x100).

II.2.5. Détermination des caractères physiologiques

Nous avons réalisé une caractérisation physiologique des souches par le biais de trois tests : (i) la mise en évidence de l'enzyme catalase, (ii) la croissance des souches dans des conditions hostiles et (iii) le développement des colonies à différentes températures. Tous les tests sont réalisés sur des cultures rajeunies préparées à partir des souches conservées à basse température sur gélose inclinée (voir section II.2.3) comme suit :

- Une culture sur bouillon MRS pour les lactobacilles ou M17 pour les lactocoques est préparée en prélevant, à l'aide d'une anse de platine stérile, quelques colonies ;
- Ces colonies sont ensuite incorporées dans le tube contenant un des bouillons MRS ou M17 préalablement stérilisés et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

II.2.5.1. Production de catalase

L'activité catalytique permet la dégradation de l'eau oxygénée en oxygène et en eau. Elle est mise en évidence en émulsionnant une à deux colonies de l'isolat de la souche à tester dans une solution fraîche d'eau oxygénée à 10 volumes. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse, traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de l'enzyme à tester (**Guiraud, 2003**).

II.2.5.2. Test de croissance dans les conditions hostiles

Pour réaliser ce test, nous avons préparé deux milieux hypersalés de NaCl : 4% et 6,5%. Après ensemencement de ces deux milieux par la souche à tester et incubation à 37°C pour 24 heures, la croissance est appréciée par apparition d'un trouble dans les tubes de culture microbienne (**Hariri et al., 2009 ; Guiraud, 2003**).

II.2.5.3. Test de croissance à différentes températures

Ce test permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles et les bactéries lactiques thermophiles. Le test est réalisé sur milieux M17 et MRS liquides à différentes températures 10°C et 40°C pendant 24 à 48 heures. Au bout de ce délai, la croissance est appréciée par l'examen des milieux, la croissance cellulaire est appréciée par la présence d'un trouble en bas du tube (**Hariri et al., 2009**).

II.2.6. Tests de caractérisation biochimique

Nous avons réalisés une caractérisation biochimique des souches par le biais des cinq tests suivants : (i) test de connaissance du type fermentaire, (ii) test d'utilisation des sucres sur milieu TSI, (iii) test Mannitol-Mobilité, (iv) production d'indole et (v) test d'utilisation de différentes sources de carbone sur milieu liquide.

II.2.6.1. Test de connaissance du type fermentaire

Ce test permet de préciser le type de métabolisme fermentaire réalisé par le micro-organisme pour transformer le substrat carboné, il consiste à mettre en évidence la formation de gaz (CO₂). De

jeunes souches préalablement préparées (voir section II.2.5) sont ensemencées dans des tubes contenant du bouillon MRS ou M17, avec une cloche de Durham. Après incubation à 37°C pendant 24–48 heures, la présence ou l'absence du gaz dans la cloche indique le type fermentaire (**Hariri et al., 2009**).

II.2.6.2. Test d'utilisation des sucres sur milieu Triple Sugar Iron (TSI)

La fermentation du glucose avec production d'acide, l'oxydation du saccharose et/ou du lactose, la libération d'H₂S et de CO₂ sont appréciées sur le milieu TSI (**Giraud, 2003**).

II.2.6.3. Test Mannitol-Mobilité

La mobilité des souches ainsi que la fermentation du mannitol sont étudiées sur le milieu Mannitol-Mobilité. La fermentation du mannitol est traduite par un virage au jaune du milieu de culture (**Giraud, 2003**).

II.2.6.4. Production d'indole

La production d'indole est recherchée sur une culture dans de l'eau peptonée exempte d'indole, après une incubation à 30°C pendant 48 heures. Quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées. La production d'indole dans ce milieu se traduit par l'apparition d'un halo rouge persistant quelques minutes (**Giraud, 2003**).

II.2.6.5. Fermentation des sucres

Les bactéries lactiques dégradent différemment les sources de carbone. L'étude de la fermentation des sucres est réalisée sur le milieu spécifique à chaque genre, additionné d'un indicateur de pH (**Bekhouché et Boulahrouf, 2005**).

La caractérisation biochimique est réalisée en tube contenant 10 ml du bouillon M17 ou bouillon MRS additionnés du pourpre de bromocrésol (0,16 g/l) et chaque fois d'un type de sucre différent. Cette préparation est stérilisée dans l'autoclave avant l'introduction de l'inoculum. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures, le virage du milieu du violet au jaune indique la fermentation du sucre (**Hariri et al., 2009**).

Les sucres que nous avons testés sont : Glucose, Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose, Melibiose, Mannitol. Nous avons effectué l'identification des souches en nous référant au manuel de Bergey (**De Vos et al., 2009**).

II.3. Analyse de la susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques

Cette approche est réalisée afin de vérifier l'aptitude des ferments à croître en présence d'antibiotiques afin de mieux apprécier le risque de transfert horizontal des gènes de résistance aux antibiotiques à partir de ces ferments vers la flore digestive humaine. Bien que la résistance aux antibiotiques soit perçue comme étant un critère de qualité technologique des ferments lactiques industriels, le risque de transfert des gènes de résistance à la flore digestive humaine représente un danger potentiel pour la santé humaine.

II.3.1. Méthode de sélection des antibiotiques testés

La consultation de la littérature scientifique nous a permis d'établir une liste préliminaire des antibiotiques les plus spécifiques aux ferments lactiques. Nous avons ensuite affiné cette liste en réalisant une enquête ciblant sept vétérinaires algériens et ce afin de définir les antibiotiques les plus couramment prescrits en Algérie pour traiter les vaches laitières. Enfin, nous avons procédé à la sélection des antibiotiques à utiliser dans notre étude en nous basant principalement sur la solubilité des antibiotiques. Ce critère est important pour des raisons pratiques puisque certains antibiotiques ne sont pas solubles dans le lait.

II.3.2. Détermination des concentrations des antibiotiques à utiliser

Nous avons consulté plusieurs articles pour définir la gamme préliminaire à tester pour chaque antibiotique (**d'Aimmo et al., 2007; Sozzi et Smiley, 1980; Stoltz et Hankinson, 1952**). Les différentes étapes de préparation des dilutions d'antibiotiques sont illustrées dans la Figure 10. Les gammes de concentrations utilisées dans cette étude sont :

- **Pen&Strep** : 0,01 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 et 5 µg/ml de lait U.H.T
- **Sulfaprime S** : 200 ; 250 ; 300 et 350 µg/ml de lait U.H.T
- **Ampicilline** : 0,01 ; 0,1 et 0,5 µg/ml de lait U.H.T

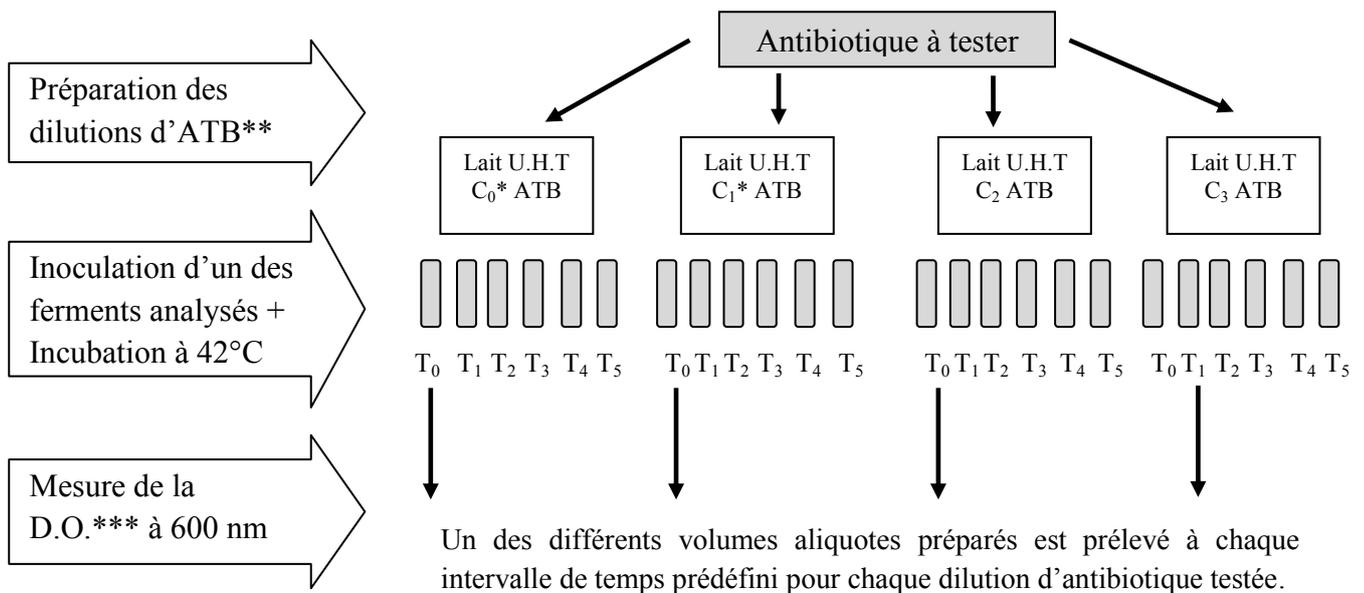


Figure 10 : Méthode utilisée pour tester la susceptibilité des ferments lactiques aux différents antibiotiques testés.

C_0^* Témoin exempt d'antibiotique, C_1^* Concentration donnée de l'antibiotique à tester.

ATB^{**} Antibiotique testé.

$D.O.^{***}$ Densité optique.

$T_0 = 0:00\text{H}$, $T_1 = 2:00\text{H}$, $T_2 = 3:00\text{H}$, $T_3 = 3:30\text{H}$, $T_4 = 4:30\text{H}$, $T_5 = 5:30\text{H}$.

II.3.3. Description des tests réalisés

La méthode que nous avons utilisée est basée sur la **Directive européenne : CVMP (2000)** et la méthode réalisée par **Stoltz et Hankinson (1952)**. Nous avons utilisé du lait écrémé UHT (0% matière grasse) maintenu à 20°C . Après inoculation avec les ferments analysés à raison de 2% (**Ministère du commerce, 2005**), nous avons homogénéisé les échantillons par agitation du lait inoculé par les ferments en forme huit. Nous avons essayé de limiter au maximum la formation de mousse (risque d'affecter la viabilité des cellules) en évitant une forte agitation. L'incubation des cultures est réalisée dans un bain thermostaté à une température comprise entre 42°C et 44°C pour les ferments du yaourt et à 30°C pour les ferments du fromage. Ces températures favorisent la multiplication des bactéries lactiques.

Nous avons réalisé plusieurs séries d'essai correspondant aux échantillons témoins n'ayant pas reçu d'antibiotiques et les échantillons ayant reçu des concentrations croissantes des trois antibiotiques testés. Afin de minimiser l'interférence avec les résultats pouvant provenir des prises d'essai à différents intervalles de temps, nous avons réparti les lots initiaux de laits inoculés en cinq lots correspondant aux nombre d'intervalles de temps utilisés dans cette étude. Lesensemencements initiaux ont été effectués à T_0 . Les intervalles de temps utilisés sont 2 heures ; 3 heures ; 3,5 heures ;

4,5 heures et 5,5 heures après l'ensemencement et l'incubation à T_0 . Les paramètres suivis sont le pH et la biomasse cellulaire (représentée par la densité optique à 600 nm). Nous avons également observé l'aspect et la consistance de la culture à chaque intervalle de temps.

II.3.2.1. Suivi du pH (profil d'acidification)

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre. La lecture du résultat est indépendamment répétée deux fois en présence d'antibiotiques et trois fois pour les témoins. La mesure du pH est réalisée dans un triple objectif :

1. Le pH est un indicateur de performance de la souche étudiée, il renseigne sur la quantité d'acide lactique produite par la souche et donc la qualité du produit final ;
2. C'est un critère reconnu pour le contrôle de la qualité des produits laitiers selon l'acidité finale recommandée par la législation de chaque pays;
3. Le profil d'acidification dépend de la composition du ferment lactique utilisé et notamment le rapport entre les fractions des différentes souches dans un mélange donné.

II.3.2.2. Suivi de la cinétique de fermentation

La densité optique à 600 nm est mesurée par le biais d'un spectrophotomètre visible UV à chaque intervalle de temps précédemment défini en l'absence (témoin) et en présence de différentes concentrations d'antibiotiques (**Directive européenne : CVMP, 2000**). La lecture de la densité optique est effectuée pour chaque tube de culture contre le blanc adéquat (lait UHT écrémé non ensemencé par les ferments lactiques). La valeur limite de linéarité de la densité optique est d'environ 0,6 (**IDF 223, 2010**).

Nous avons calculé le ratio de la croissance en présence des antibiotiques par rapport à la croissance du témoin (en absence des antibiotiques) en utilisant l'équation 2 :

$$\text{Ratio de croissance (\%)} = (\text{D.O. échantillon} / \text{D.O. témoin}) \times 100 \quad \text{Equation 2}$$

Cette valeur est exprimée en pourcentage de densité optique par rapport à la référence (**Thirabunyanon et al., 2009**) et représente la susceptibilité des différents ferments lactiques aux antibiotiques testés.

II.3.4. Dénombrement des populations bactériennes au terme de la fermentation

Nous avons dénombré les bactéries présentes dans le témoin (en l'absence des antibiotiques) au terme de la fermentation ainsi que dans les différents intervalles de temps de notre étude (excepté pour l'intervalle T_3 en raison de l'impossibilité de l'achèvement du dénombrement pendant les 30 minutes

qui séparent T₃ et T₄). Nous nous sommes contentés de dénombrer les ferments Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex® en raison de l'insuffisance des quantités de ferments du fromage procurés pour réaliser ce dénombrement.

Le dénombrement est effectué sur géloses M17 et MRS acidifié à pH 5,4 (Tableau 18). Après ensemencement en masse pour les deux milieux de culture, trois dilutions sont testées pour chaque ferment à chaque intervalle de temps. Le diluant utilisé est l'eau peptonée tamponnée. Le contenu du tube (lait UHT inoculé de ferments lactiques) est agité vigoureusement avant le prélèvement de 1 ml pour préparer la dilution 10⁻¹ et ainsi de suite pour le reste des dilutions à préparer. Les boîtes de Pétri contenant entre 25 et 250 colonies lenticulaires sont énumérées (Chougrani *et al.*, 2008). Chaque expérience est indépendamment répétée deux fois. La moyenne arithmétique des deux lectures des boites de Pétri est calculée pour chaque dilution.

Tableau 18 : Conditions expérimentales pour le dénombrement de la flore lactique à différents intervalles de temps au cours de l'acidification du lait par les ferments du yaourt

<i>Bactérie lactique</i>	<i>Milieu de culture</i>	<i>Dilutions testées</i>	<i>Conditions d'incubation</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	M17	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ et 10 ⁻⁷	37°C pendant 24 à 48h
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	MRS acidifié à pH 5,4	10 ⁻⁵ , 10 ⁻⁶ et 10 ⁻⁷	37°C pendant 48 à 72h

Le Log UFC/ml des colonies dénombrées (n) dans une boîte de Pétri ensemencée par une dilution dénombrable 10^{-x} (25 < n < 250) est calculé selon l'équation 3:

$$\text{Log UFC/ml} = \text{Log} (n \times 1/10^{-x}) = \text{Log } C_{\text{UFC/ml}} \quad \text{Equation 3}$$

Les résultats sont exprimés après observation des aspects des colonies (Lactocoques et Lactobacilles).

II.4. Étude Delphi des perspectives de développement de ferments lactiques autochtones

Les objectifs de cette étude sont de :

- Définir le contexte actuel de l'utilisation des ferments commerciaux dans l'industrie laitière algérienne et ;

- Explorer les contraintes et limitations qui font face à la valorisation des résultats de recherche obtenus par différents chercheurs spécialistes dans le domaine des bactéries lactiques isolées de la flore microbienne autochtone, afin de fabriquer des ferments commerciaux algériens.

Nous avons préparé deux questionnaires différents : le premier destiné à des entreprises de transformation laitière et le deuxième destiné à un panel de chercheurs algériens spécialistes dans le domaine des bactéries lactiques.

II.4.1. Méthode Delphi

Pour cette étude, nous avons utilisé la méthode Delphi en consultant un panel d'experts scientifiques et industriels. Cette méthode a été utilisée dans plusieurs contextes nécessitant la suscitation des opinions d'experts (**Grundy et Ghazi, 2009**). Notre objectif à travers cette étude était de mettre en évidence les convergences d'opinions afin de dégager des consensus grâce à l'interrogation d'un groupe d'industriels et d'experts dans plusieurs domaines de recherche relatifs aux bactéries lactiques à l'aide de questionnaires.

II.4.2. Approche de sélection des répondants

La méthode d'échantillonnage (choix des répondants) constitue un facteur important par rapport à la qualité des résultats recueillis par le biais d'une enquête Delphi. La technique d'échantillonnage non probabiliste (*c.-à-d.* l'échantillonnage par critère) est généralement acceptée comme appropriée dans les études Delphi étant donné que l'opinion d'experts est sollicitée (**Powell, 2003**).

Nous avons contacté dix entreprises spécialisées dans la transformation laitière réparties dans la région Est et Centre du territoire algérien. Les coordonnées de ces entreprises ont été obtenues par le biais des renseignements marqués sur l'emballage de leurs produits disponibles sur le marché national et la consultation de leurs sites Web. Pour ce qui est des chercheurs spécialistes dans le domaine des bactéries lactiques, nous avons effectué une recherche bibliographique en utilisant les mots clés suivants : *bactéries lactiques Algérie, ferments lactiques Algérie, industrie laitière Algérie, filière lait Algérie*. Nous avons effectué une recherche également au niveau des sites des universités dont faisaient part les experts identifiés et ce afin de trouver des informations concernant leurs travaux de recherche. Nous avons ainsi réussi à identifier neuf chercheurs dans différentes universités algériennes ayant publié dans le domaine. Nous avons également sollicité des enseignants ayant contribué à la formation Magister en « Biotechnologie Alimentaire » (INATAA, promotion 2010 – 2012).

II.4.3. Description des questionnaires

II.4.3.1. Questionnaire destiné aux unités de production

Le questionnaire que nous avons utilisé est présenté dans l'Annexe 6. Ce questionnaire contient 21 questions partagées entre quatre sections comme suit :

- Six questions générales à propos de l'unité de production ;
- Neuf questions sur l'utilisation des ferments lactiques dans l'industrie laitière locale ;
- Deux questions ouvertes sur les enjeux et défis de l'industrie laitière en Algérie, et
- Quatre questions relatives aux perspectives de développement de nouveaux produits laitiers.

Le contact direct avec les spécialistes du terrain nous a permis aussi bien de trouver des réponses aux questions posées dans le questionnaire ainsi que de mieux apprécier leur quotidien et recenser leurs perceptions par rapport aux contraintes et défis liés à la filière.

II.4.3.2. Questionnaire destiné aux chercheurs/experts dans le domaine des bactéries lactiques

Le questionnaire destiné aux chercheurs algériens dans le domaine des bactéries lactiques est présenté dans l'Annexe 6. Ce questionnaire contient exclusivement des questions ouvertes afin d'encourager les répondants à s'exprimer librement sur les aspects qui leur semblent les plus importants. Une introduction du questionnaire destiné aux experts contenait une présentation de la population visée par ce questionnaire ainsi qu'une brève explication de l'objectif visé.

Ce questionnaire comprend trois sections différentes :

- La première section contient des informations générales sur le répondant ;
- La deuxième section contient cinq questions ouvertes sur les enjeux et défis de l'industrie laitière en Algérie (l'industrie laitière locale, les aliments fermentés et les ferments lactiques) ;
- La troisième section (facultative) invite les répondants à évaluer le questionnaire et suggérer des propositions pour son amélioration.

II.4.4. Administration du questionnaire et recueil de données

Nous avons diffusé le questionnaire destiné aux chercheurs par courriel. Par contre, le questionnaire destiné aux entreprises fut communiqué en personne par l'auteur en interviewant un des responsables dans la chaîne de production et parfois plusieurs au sein de la même unité (notamment chef de production, responsable qualité, responsable collecte ou approvisionnement, directeur technique ou encore chef de laboratoire de l'unité de production laitière). Le plus souvent, le

questionnaire fut rempli lors d'une visite de l'unité de production. Cependant, en raison des difficultés d'accès à certaines entreprises, nous étions contraints parfois d'envoyer le questionnaire par courriel ou Fax, accompagné d'une lettre et/ou d'une communication téléphonique expliquant l'objectif. Cette démarche était nécessaire afin de faciliter le déroulement de l'enquête avec les industriels qui ne sont pas habitués à de telles enquêtes.

II.4.5. Traitement des informations

Nous avons analysé les réponses recueillies dans les questionnaires en essayant de dégager les concepts principaux qui se répètent (questions ouvertes). Nous avons utilisé des cartes heuristiques pour représenter les informations recueillies dans l'enquête et faire ressortir les liens entre les différentes idées exprimées par les répondants des deux groupes (chercheurs et industriels). Une carte heuristique (ou carte conceptuelle) est un moyen utile pour visualiser les relations entre plusieurs éléments à travers une représentation arborescente des données. La fréquence d'un concept étant liée à sa signification (**Grundy et Ghazi, 2009**), l'analyse des questions à choix multiples est réalisée en choisissant les réponses les plus fréquemment citées par les experts consultés.

Résultats & Discussion

I) RÉSULTATS

I.1. Contrôle de la qualité microbiologique des ferments lactiques

I.1.1. Recherche et dénombrement des Coliformes

Aucun des échantillons des ferments lactiques étudiés n'a présenté un résultat positif. Ce résultat indique que les ferments étudiés sont exempts de coliformes.

I.1.2. Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux

Les résultats de la recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux sont présentés dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Dénombrement des Streptocoques fécaux sur milieu Rothe liquide par méthode NPP dans les différents types de ferments étudiés.

<i>Ferments lactiques</i>	<i>Fabricant</i>	<i>Dilution</i>	<i>Test présomptif</i>	<i>Test confirmatif</i>
Lyofast Y 456 B	Sacco	10 ⁻¹	3	3
		10 ⁻²	3	2
		10 ⁻³	2	2
YC-180 Yo-Flex®	Hansen	10 ⁻¹	3	0
		10 ⁻²	0	0
		10 ⁻³	0	0
CHN-11	Hansen	10 ⁻¹	2	0
		10 ⁻²	0	0
		10 ⁻³	0	0
SALSA 1	Hansen	10 ⁻¹	0	0
		10 ⁻²	0	0
		10 ⁻³	0	0
ALPHA 10	Coquard	10 ⁻¹	3	0
		10 ⁻²	3	0
		10 ⁻³	0	0

Nous avons constaté que la majorité des ferments analysés ne présentent aucun résultat positif de présence de Streptocoques fécaux mis à part le ferment Lyofast Y 456 B (Sacco). La lecture sur la table de Mac Grady donne un NPP de 20 entérocoques pour 10 g de produit analysé.

I.1.3. Recherche des Salmonelles

Aucun résultat positif de présence de salmonelles n'a été trouvé pour l'ensemble des ferments analysés.

I.1.4. Recherche et dénombrement des levures et moisissures

Nous avons remarqué l'absence totale des champignons microscopiques dans les échantillons de ferments YC-180Yo-Flex® et SALSA 1 (Chr. Hansen). Pour les ferments Lyofast Y 456 B (Sacco), CHN-11 (Chr. Hansen) et ALPHA 10 (Coquard), le nombre de levures et/ou moisissures constaté n'était pas statistiquement significatif.

I.1.5. Recherche et dénombrement de la FTAM

Le Tableau 20 représente les résultats du dénombrement de la flore totale aérobie mésophile dans les différents échantillons de ferments réhydratés analysés (voir Matériel et méthodes, section II.1.1).

Tableau 20 : Dénombrement de la FTAM dans les différents échantillons de ferments réhydratés analysés.

Ferments	Lyofast Y 456 B	YC-180 - Yo-Flex®	CHN-11	SALSA 1	ALPHA 10
Moyenne (germes / g)	1,5 x 10 ⁴	9,4 x 10 ³	NS	3,77 x 10 ⁵	9,7 x 10 ³

I.1.6. Recherche et dénombrement des Staphylocoques

Aucun résultats positif n'a été détecté. Les résultats du dénombrement des différents germes de contamination dans les échantillons de ferments lactiques analysés sont présentés dans le Tableau 21.

Tableau 21 : Moyennes des germes isolés et dénombrés dans les différents ferments étudiés.

Ferments analysés	Moyenne (UFC/g)						FTAM*
	CT*	EC*	ST*	SA*	LM*		
					L	M	
Lyofast Y 456 B	ABS**	20	ABS	ABS	ABS	NS**	1,5x10 ⁴
YC-180 - Yo-Flex®	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	9,4 x10 ³
CHN-11	ABS	ABS	ABS	ABS	NS	NS	NS
SALSA 1	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS	3,77 x10 ⁵
ALPHA 10	ABS	ABS	ABS	ABS	NS	NS	9,7 x10 ³

*Coliformes totaux (CT), Entérocoques (EC), Staphylocoques (ST), Salmonelle (SA), Levures et moisissures (LM), Flore totale aérobie mésophile (FTAM).

** (ABS) absence, (NS) Non significatif.

I.2. Caractérisation des ferments commerciaux

Nous avons analysé les ferments Lyofast Y 456 B (Sacco), YC-180 Yo-Flex®, CHN-11, SALSA 1 (Chr. Hansen) et ALPHA 10 (Coquard) afin de connaître les genres bactériens qui les composent et la confirmation de la composition des ferments indiqués sur les fiches techniques des ferments par leurs fabricants. Cette caractérisation représente une étape préliminaire essentielle précédant l'analyse moléculaire.

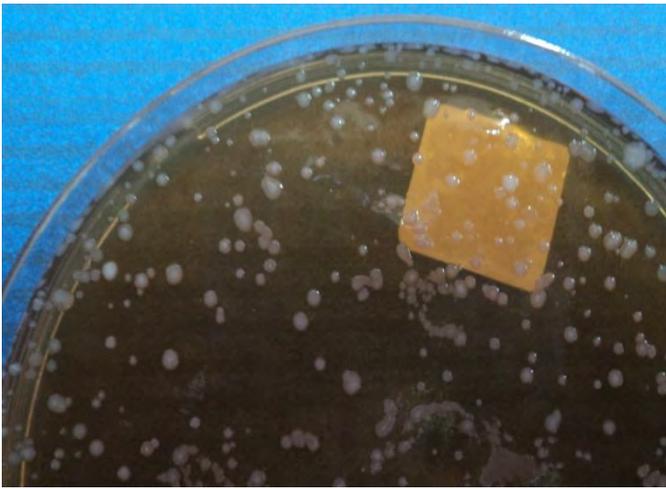
I.2.1. Caractères morphologiques

Le Tableau 22 décrit l'aspect macroscopique des colonies des différentes souches isolées.

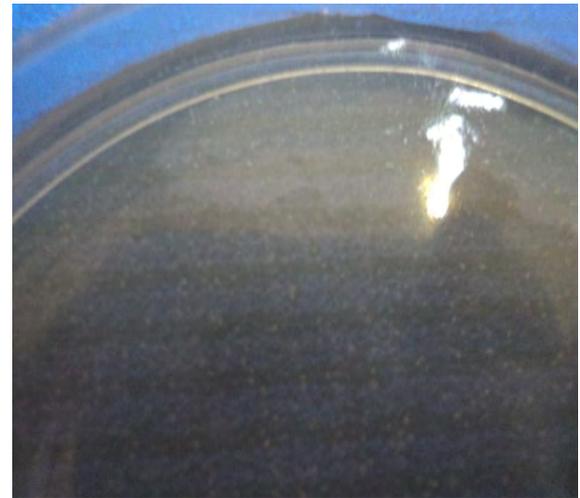
Tableau 22: Caractères cultureux des colonies des différentes souches purifiées à partir des mélanges des ferments non caractérisés

Ferment	Souche	Caractères cultureux
YC-180 Yo-Flex®	LS1	Colonies lenticulaires blanches de 1 à 2 mm de diamètre, de surface lisse et de contour régulier.
	LS2	Colonies circulaires, de couleur blanche, allant de 1 à 4 mm de diamètre, de surface lisse plus ou moins bombées et de contour régulier.
	LH1	Colonies lenticulaires blanches de 1 à 2 mm de diamètre, de surface lisse et de contour régulier.
	LH2	Colonies circulaires, de couleur blanche, allant de 1 à 4 mm de diamètre, de surface lisse plus ou moins bombées et de contour régulier.
SALSA 1	LX	Colonies visqueuses jaunes qui tournent vers l'orange après réfrigération, centre bombée, de grande taille avec un diamètre 5 mm, contour ondulé irrégulier. Présence de quelques colonies ayant les mêmes caractéristiques mais de couleur blanc lait.
ALPHA 10	LF1	Colonies circulaires, de petite taille (1 mm de diamètre), de couleur blanche, de surface lisse légèrement bombées et de contour régulier.
	LF2	Colonies blanches circulaires, lisses, de petite taille.
	LF3	Colonies lenticulaires, lisses, blanches, petites à contour régulier.
	LF4	Colonies de couleur jaune pâle, translucides, lisses, convexes et visqueuses, trop petites. Après réfrigération les colonies deviennent blanches.
CHN-11	LM1	Colonies circulaires, de petite taille (1 mm de diamètre), de couleur blanche, de surface lisse légèrement bombées et de contour régulier.
	LM2	Colonies blanches circulaires, lisses, de petite taille.
	LM3	Colonies lenticulaires, lisses, blanches, petites à contour régulier.
	LM4	Colonies de couleur jaune pâle, translucides, lisses, convexes et visqueuses, trop petites. Après réfrigération les colonies deviennent blanches.

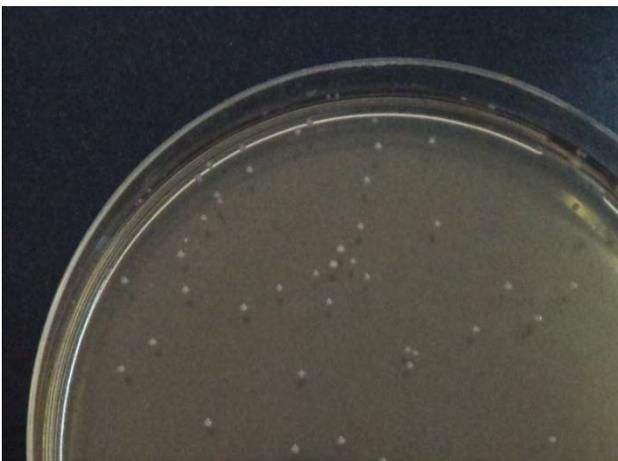
La Figure 11 illustre l'aspect des colonies des différentes souches isolées.



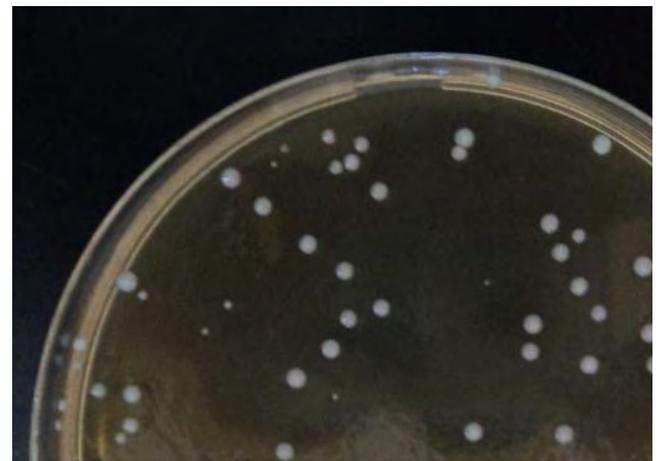
Ferment Lyofast Y 456 B



Souche LM4 isolée du ferment CHN-11



Souche LH1 isolée du ferment YC-180 Yo-Flex®



Souche LS2 isolée du ferment YC-180 Yo-Flex®



Souche LX isolée du ferment SALSA 1

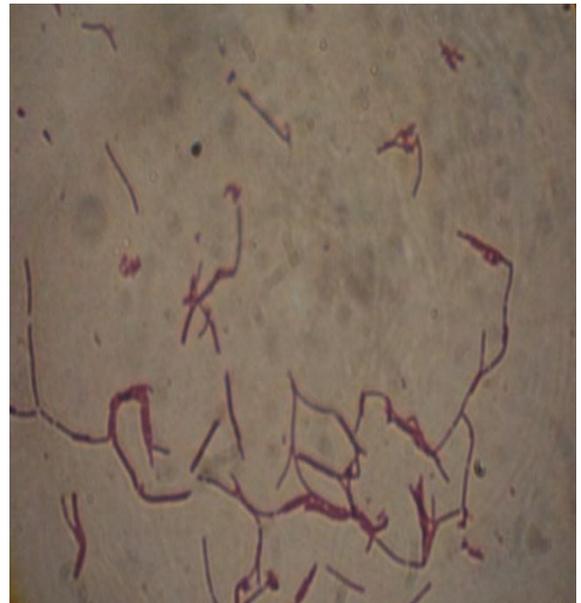
Figure 11 : Aspects macroscopiques des colonies de différentes souches isolées à partir des ferments Lyofast Y 456 B, YC-180 Yo-Flex®, CHN-11, SALSA 1 et ALPHA 10.

[Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber-Shot DSC-510].

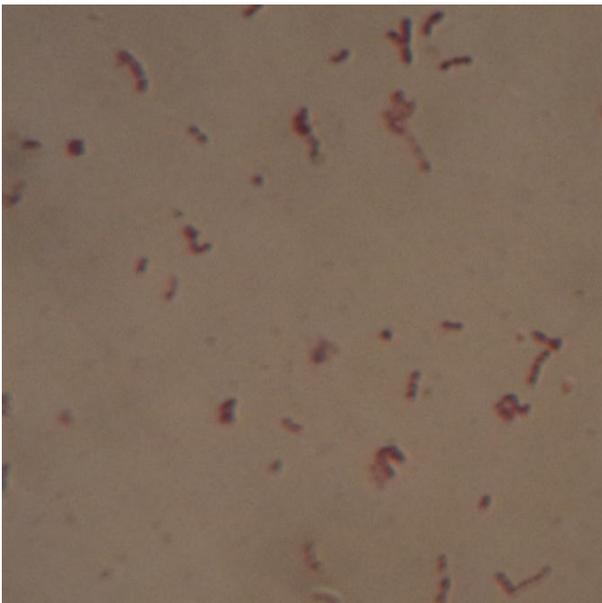
Nous avons réalisé trois repiquages successifs afin de veiller à la pureté des souches isolées. Les cellules étaient examinées sous microscope optique en immersion (x100) pour différencier la morphologie et la disposition des cellules après coloration de Gram (Figure 12).



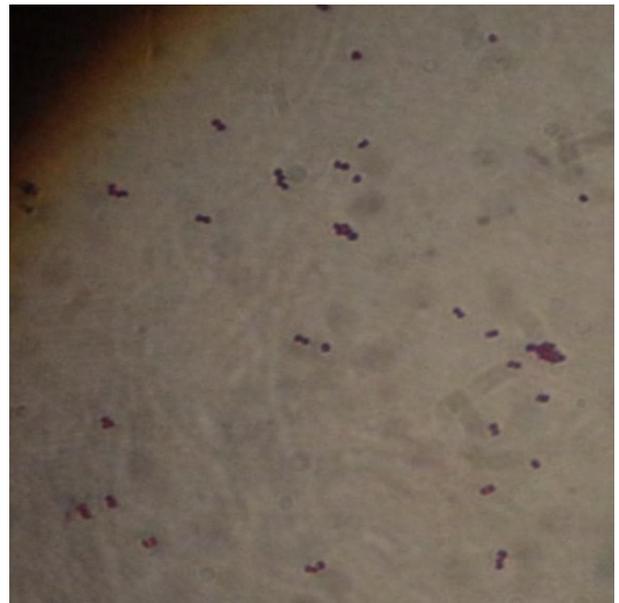
Souche LH1 isolée du ferment YC-180 Yo-Flex®



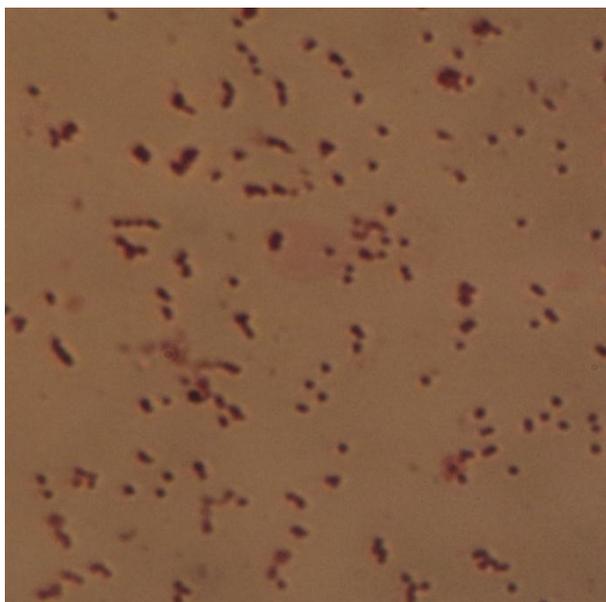
Souche LS2 isolée du ferment YC-180 Yo-Flex®



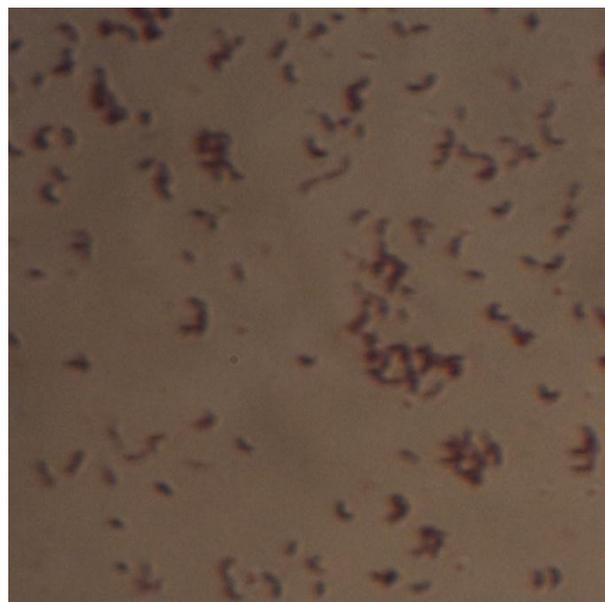
Souche LM1 isolée du ferment CHN-11



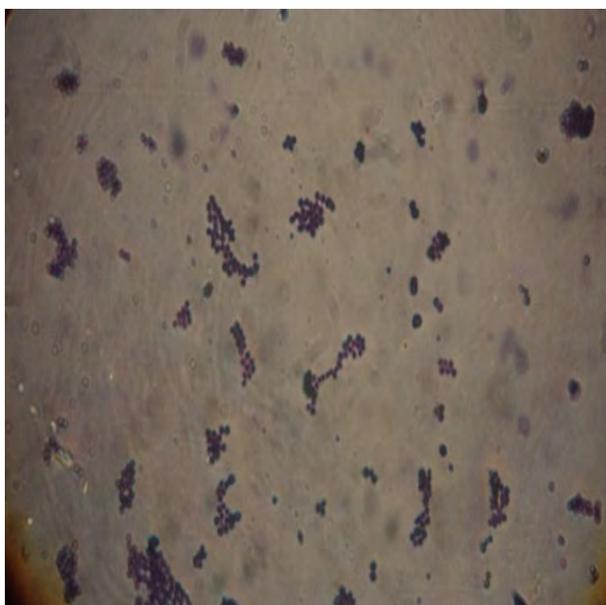
Souche LM2 isolée du ferment CHN-11



Souche LM3 isolée du ferment CHN-11



Souche LM4 isolée du ferment CHN-11



Souche LX isolée du ferment SALSA 1

Figure 12 : Aspects microscopiques (coloration de Gram et observation à grossissement x100) des colonies de différentes souches isolées à partir des mélanges non caractérisés représentant les ferments YC-180 Yo-Flex®, CHN-11 et SALSA 1.

[Photos prises avec un appareil photo numérique Sony Cyber-Shot DSC-510]

Comme le démontre la Figure 12, les bactéries lactiques se différencient par leurs caractères morphologiques (coques ou bacilles), par leur taille ainsi que par le type d'agencement des cellules. Une brève description est présentée dans le Tableau 23.

Tableau 23 : Description de l'aspect microscopique des différentes souches lactiques purifiées à partir des mélanges des ferments non caractérisés

Ferment	Souche	Aspect microscopique		
		Gram	Forme des cellules	Association des cellules
YC-180 Yo-Flex®	LS1	positif	coques	associées en chaînettes
	LS2	positif	bâtonnets	disposées en courtes chaînettes.
	LH1	positif	coques	associées en chaînettes.
	LH2	positif	bâtonnets	disposées en courtes chaînettes.
SALSA 1	LX	positif	coques	formant des amas de cellules.
ALPHA 10	LF1	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînettes.
	LF2	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînes.
	LF3	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînes.
	LF4	positif	ayant une forme entre des coques ovoïdes et des courts bâtonnets (coccobacilles à extrémités arrondies).	isolées ou en paires et formant aussi de petites chaînettes.
CHN-11	LM1	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînettes.
	LM2	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînes.
	LM3	positif	rondes	associées en paires ou en courtes chaînes.
	LM4	positif	ayant une forme entre des coques ovoïdes et des courts bâtonnets (coccobacilles à extrémités arrondies).	isolées ou en paires et formant aussi de petites chaînettes.

1.2.3. Caractères physiologiques

Toutes les souches lactiques isolées sont à Gram positif et à catalase négative sauf *Sataphylococcus Xylosus*.



Figure 13 : Test catalase pour la souche LX.

L'ensemble des caractères physiologiques étudiés est résumé dans le Tableau 24.

Tableau 24 : Récapitulatif des caractères physiologiques des souches isolées et purifiées à partir des mélanges des ferments non caractérisés

Ferment	Souche	Catalase	Croissance à		Croissance à		Type fermentaire
			10°C	40°C	4% NaCl	6,5% NaCl	
YC-180 Yo-Flex®	LS1	-	-	+	-	-	Homofermentaire
	LS2	-	-	+	-	-	Homofermentaire
	LH1	-	-	+	-	-	Homofermentaire
	LH2	-	-	+	-	-	Homofermentaire
SALSA 1	LX	+	+	-	+	+	Hétérofermentaire
ALPHA 10	LF1	-	+	-	-	-	Homofermentaire
	LF2	-	+	-	+	-	Homofermentaire
	LF3	-	+	-	+	+	Homofermentaire
	LF4	-	+	-	-	-	Hétérofermentaire
CHN-11	LM1	-	+	-	-	-	Homofermentaire
	LM2	-	+	-	+	-	Homofermentaire
	LM3	-	+	-	+	+	Homofermentaire
	LM4	-	+	-	-	-	Hétérofermentaire

I.2.4. Caractères biochimiques

Les souches lactiques étudiées sont immobiles et non productrices d'indole. Les profils de fermentation de sucres sont présentés dans le Tableau 25.

Nous avons comparé l'ensemble des observations recueillies de l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques en nous référant au manuel de Bergey (**De Vos et al., 2009**), afin d'élaborer un bilan des souches dont les caractéristiques sont les plus proches à nos observations. Ce bilan est présenté dans le Tableau 26. Il regroupe les souches les plus probables à être présentes dans les ferments analysés, cependant la confirmation par les méthodes biochimiques poussées (Galeries API 50), voire moléculaires (PCR) est nécessaire.

Tableau 25 : Profils de fermentation des sucres par les souches lactiques purifiées à partir des mélanges des ferments non caractérisés

Ferment	Souche	Sucres							
		<i>Glucose</i>	<i>Galactose</i>	<i>Fructose</i>	<i>Saccharose</i>	<i>Lactose</i>	<i>Maltose</i>	<i>Melibiose</i>	<i>Mannitol</i>
YC-180 Yo-Flex®	LS1	+	+	+	+	+	-	+	-
	LS2	+	-	+	-	+	-	-	-
	LH1	+	+	+	+	+	-	+	-
	LH2	+	-	+	-	+	-	-	-
SALSA 1	LX	+	+	+	+	+	+	-	+
ALPHA 10	LF1	+	+	-	-	+	-	-	-
	LF2	+	+	-	-	+	+	-	-
	LF3	+	-	-	-	-	+	-	-
	LF4	+	+	-	-	+	-	-	-
CHN-11	LM1	+	+	-	-	+	-	-	-
	LM2	+	+	-	-	+	+	-	-
	LM3	+	-	-	-	-	+	-	-
	LM4	+	+	-	-	+	-	-	-

(+) Utilisation du sucre marquée par le virage de couleur du BCP vers le jaune.

(-) Pas de virage : la souche ne fermente pas le sucre indiqué.

Tableau 26 : Bilan des bactéries lactiques isolées à partir des mélanges des ferments non caractérisés

Ferment	Code	Souche présumée
YC-180 Yo-Flex® : Ferment lactique spécifique pour yaourt (ensemencement direct)	LS1	<i>Sterptococcus salvivarius thermophilus</i>
	LS2	<i>Lactobacillus delbruekii bulgaricus</i>
	LH1	<i>Sterptococcus salvivarius thermophilus</i>
	LH2	<i>Lactobacillus delbruekii bulgaricus</i>
SALSA 1 : Souche pour affinage et aromatisation de fromage	LX	<i>Staphylococcus xylosus</i>
ALPHA 10 : Mélange de cultures mésophiles acidifiantes homo et hétéro fermentaires	LF1	<i>Lactococus lactis cremoris</i>
	LF2	<i>Lactococus lactis lactis</i>
	LF3	<i>Lactococus biovar diacetylactis</i>
	LF4	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>
CHN-11 : Culture mixte de ferments lactiques mésophiles aromatiques et acidifiants	LM1	<i>Lactococus lactis cremoris</i>
	LM2	<i>Lactococus lactis lactis</i>
	LM3	<i>Lactococus biovar diacetylactis</i>
	LM4	<i>Leuconostoc mesenteroides cremoris</i>

I.3. Évaluation de la susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques

I.3.1. Performance des ferments en l'absence des antibiotiques

I.3.1.1. Cinétique d'acidification

L'évolution du pH lors de la fermentation du lait inoculé par les différents échantillons de ferments lactiques analysés est illustrée dans la Figure 14. Il ressort de la Figure 18 que le pH des laits fermentés par les ferments YC-180 Yo-Flex® (Chr. Hansen) et Lyofast Y 456 B (Sacco) du yaourt présentent les valeurs les plus basses du pH et à moindre degré pour les ferments du fromage CHN-11 (Chr. Hansen) et ALPHA 10 (Coquard). Par contre, la culture d'affinage du fromage (ferment SALSA 1) contribue à une légère augmentation du pH puisque son rôle principal est l'affinage et non la coagulation qui se réalise principalement par diminution de pH.

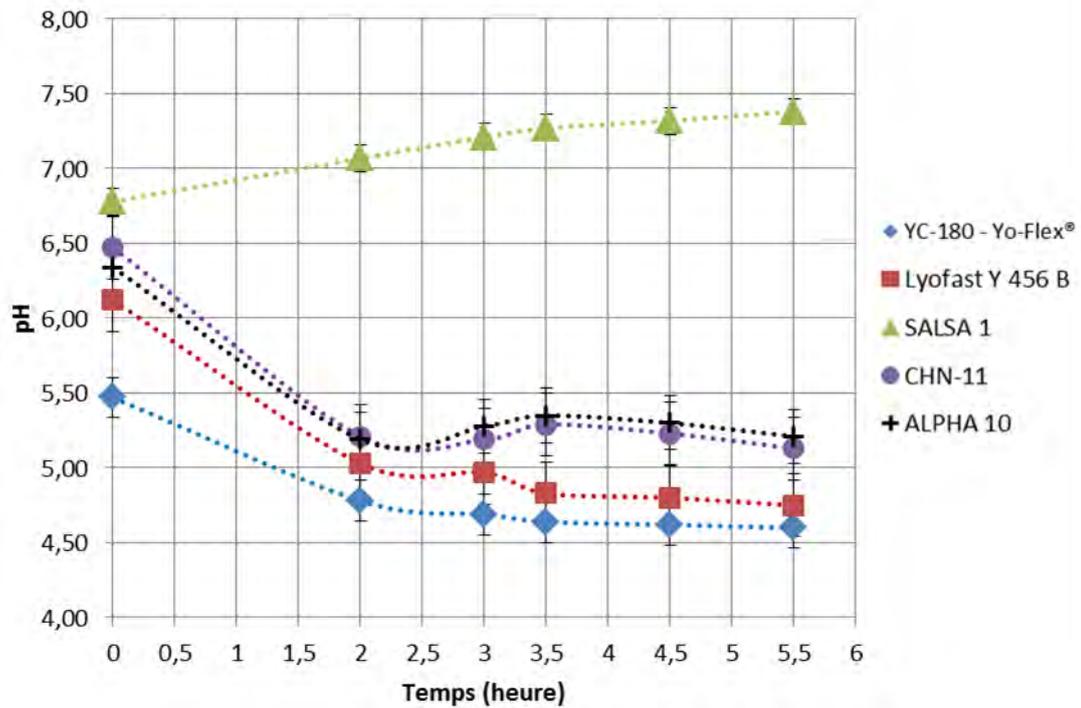


Figure 14 : Profil d'acidification des ferments lactiques dans des échantillons de laits inoculés à raison de 2% en l'absence des antibiotiques

1.3.1.2. Cinétique de croissance cellulaire

La cinétique de croissance cellulaire dans des échantillons de lait inoculés par les différents ferments étudiés (YC-180 - Yo-Flex®, Lyofast Y 456 B, CHN-11 et ALPHA 10) est illustrée dans la Figure 15.

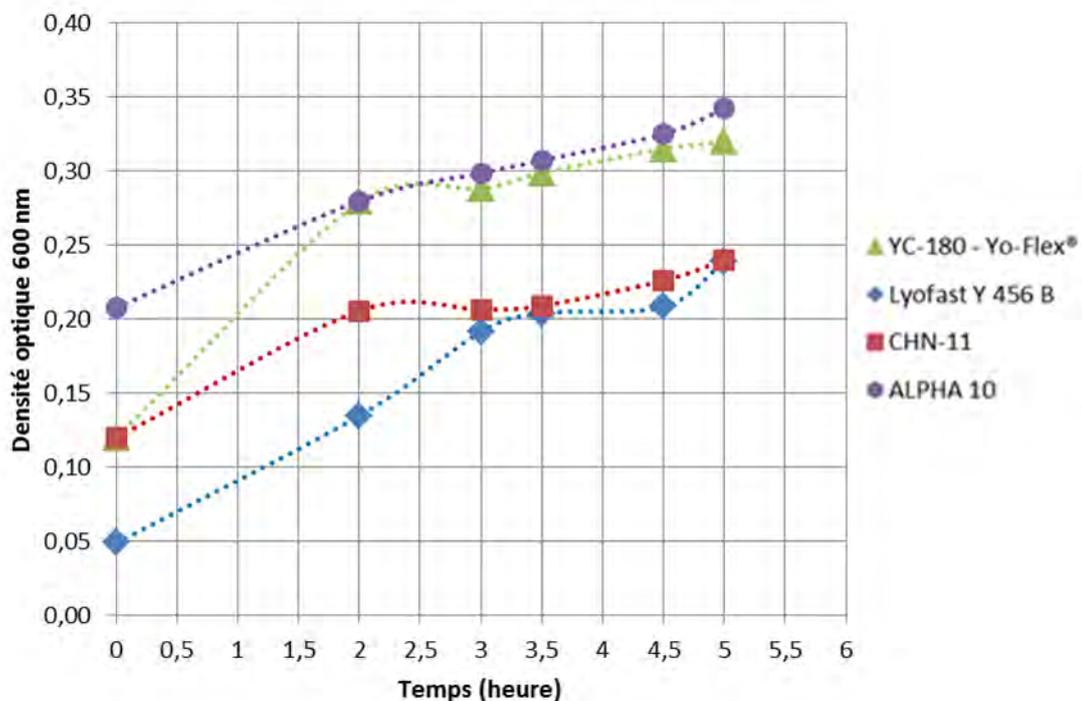


Figure 15 : Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques dans des échantillons de laits inoculés à raison de 2% en l'absence des antibiotiques.

Bien que les échantillons du lait soient inoculés à raison de 2% pour tous les ferments lactiques analysés, nous avons remarqué que les points initiaux à T_0 ne coïncident pas pour tous les ferments. Ceci pourrait être justifié par la variabilité de la texture et la finesse des granules des ferments lactiques d'une firme à une autre (Annexe 1). Cette variabilité leur conférerait des propriétés optiques différentes. Les textures des ferments dépendent du procédé technologique de fabrication et conditionnement des ferments (en particulier le procédé de lyophilisation). Une même quantité de ferments ne contient pas le même nombre de cellules, d'autant plus que la quantité de ferments dans les échantillons analysés n'est pas exprimée en grammes mais plutôt en termes d'Unités d'utilisation définies par le fabricant. En effet, les ferments YC-180 Yo-Flex® et CHN-11 qui proviennent du même fabricant (Chr. Hansen), donnent la même valeur de la densité optique à 600 nm (voir Figure 15) ce qui indique qu'ils ont la même quantité initiale de cellules à T_0 pour une même quantité inoculée.

Il ressort de la Figure 15 qu'au cours du temps de fermentation, il y'a augmentation de la biomasse des différents ferments étudiés. Nous avons pu suivre l'évolution de la densité optique jusqu'à quinze heures de fermentation (voir Annexe 7). Au-delà de ce temps, nous avons constaté que le nombre de cellules des ferments lactiques est plus important dans les ferments du fromage. Ceci pourrait indiquer la multiplication continue des espèces présentes ou éventuellement une contamination ou un mécanisme que nous n'avons pas identifié.

1.3.2. Performance des ferments en présence des antibiotiques

1.3.2.1. Effet des antibiotiques sur la cinétique d'acidification

Les cinétiques d'acidification des laits inoculés par les ferments du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline sont illustrées dans les Figures 16(a) – (c) respectivement.

Il ressort de la Figure 16 que le ferment Lyofast Y 456 B (Sacco) est le plus susceptible aux antibiotiques testés en comparaison avec le ferment YC-180 Yo-Flex® (Chr. Hansen). En présence des concentrations maximales testées des antibiotiques considérés, nous avons observé une augmentation du pH final de 29,3% pour Lyofast Y 456 B et 24,8 % pour YC-180 Yo-Flex® en présence de Pen&Strep, 35,6 % pour Lyofast Y 456 B et 2,4% pour YC-180 Yo-Flex® en présence de Sulfaprime S et 19,6% pour Lyofast Y 456 B et 2,6 % YC-180 Yo-Flex® en présence de l'Ampicilline.

1.3.2.2. Effet des antibiotiques sur la croissance cellulaire

L'effet de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline sur la croissance cellulaire des ferments du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 - Yo-Flex®) ainsi que les ferments utilisés pour la fabrication du fromage (ALPHA 10 et CHN-11) est illustré dans les Figures 17 – 18 respectivement.

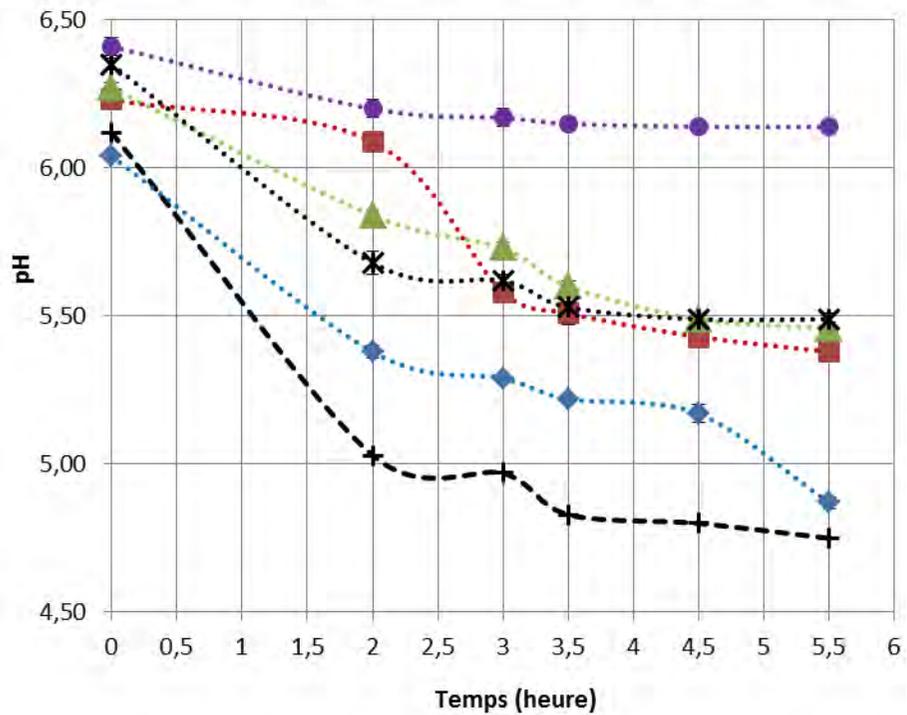
Il apparaît dans les Figures 17–18 que la présence des antibiotiques entraîne un ralentissement de la croissance cellulaire et une diminution de la biomasse finale atteinte au terme de la fermentation. Cet effet est proportionnel à la concentration de l'antibiotique. Nous avons cependant constaté que les ferments du fromage (ALPHA 10 et CHN-11) exhibent une résistance prononcée envers Sulfaprime S et ce dans toute la gamme de concentrations testées (voir Figure 18(b)). Cependant, la forme générale des courbes de croissance indiquent que les cellules gardent une aptitude à croître même en présence des antibiotiques. Il convient de rappeler que les antibiotiques agissent sur la cellule bactérienne chacun selon son mode d'action. Les valeurs les plus basses de croissance pour les ferments du yaourt ont été observées avec le ferment Lyofast Y 456 B, et avec CHN-11 pour les ferments du fromage. Le ferment Lyofast Y 456 B est le ferment le plus susceptible aux antibiotiques dans la gamme des ferments testés. La densité optique enregistrée en présence de 350 µg/ml de Sulfaprime S est inférieure à 0,05 et ce après cinq heures et demi de fermentation.

La Figure 19(a) – (b) illustre l'effet de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline sur la biomasse finale obtenue au terme de la fermentation (après 5,5 heures d'incubation) et ce pour les deux catégories de ferments analysés : ferments du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 - Yo-Flex®) et ferments utilisés pour la fabrication du fromage (ALPHA 10 et CHN-11). Les valeurs de croissance sont exprimées en pourcentage des valeurs de croissance (représentées par la densité optique à 600 nm) obtenues en l'absence des antibiotiques.

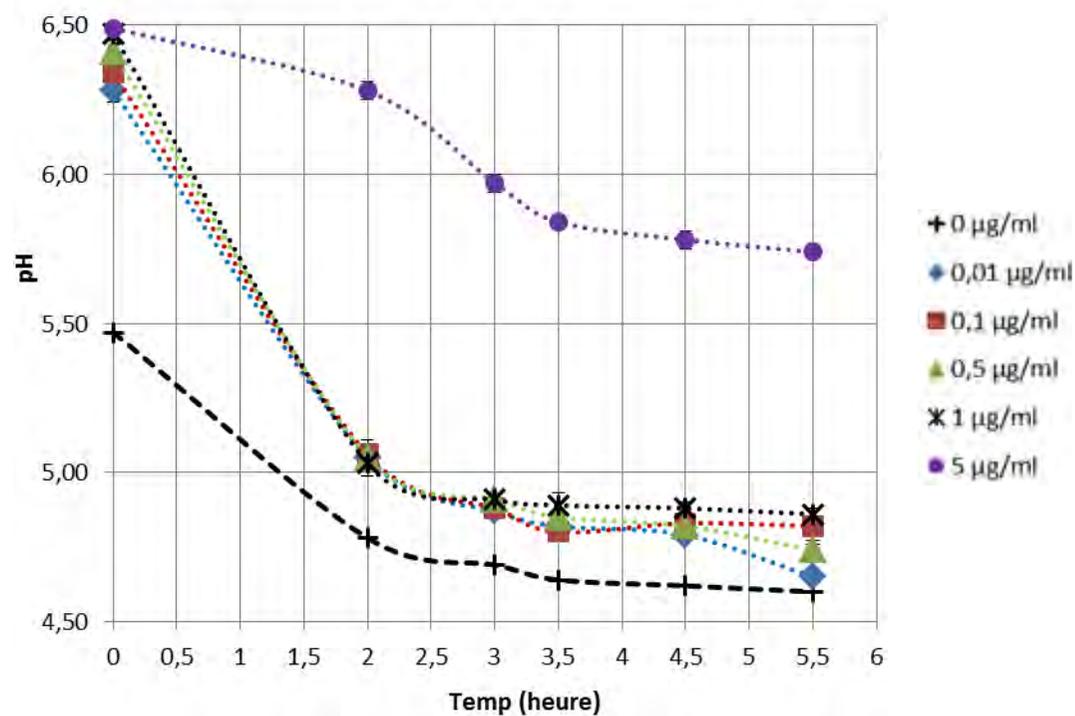
Il ressort de la Figure 19 que pour les ferments du yaourt, le ferment Lyofast Y 456 B est le plus susceptible aux antibiotiques présentant ainsi le taux de croissance le plus faible par rapport au ferment YC-180 Yo-Flex® qui a présenté un taux de croissance relativement élevé en présence des différents antibiotiques testés (valeur maximale de 95,6 % en présence de 350 µg/ml de Sulfaprime S).

Pour les ferments du fromage, nous avons remarqué une croissance similaire des deux ferments ALPHA 10 et CHN-11 en présence de Pen&Strep et de Sulfaprime S pour toutes les concentrations. Cependant le ferment le plus résistant est le ferment ALPHA 10 avec une croissance relative de 68,1% en présence de 200 µg/ml Pen&Strep et de 97,0% en présence de 350 µg/ml de Sulfaprime S.

Lyofast Y 456 B

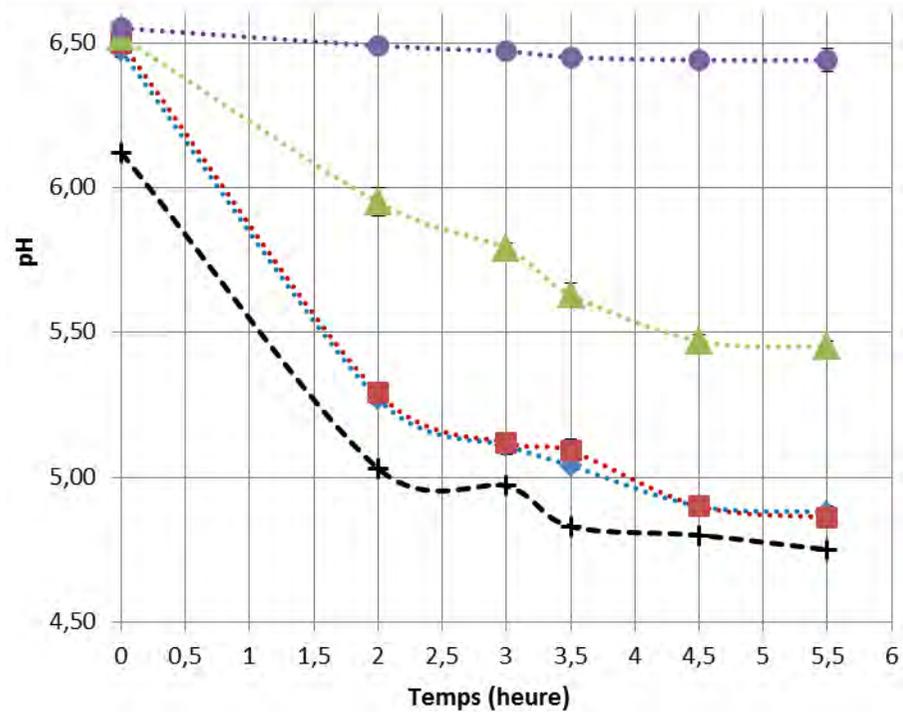


YC-180 Yo-Flex®

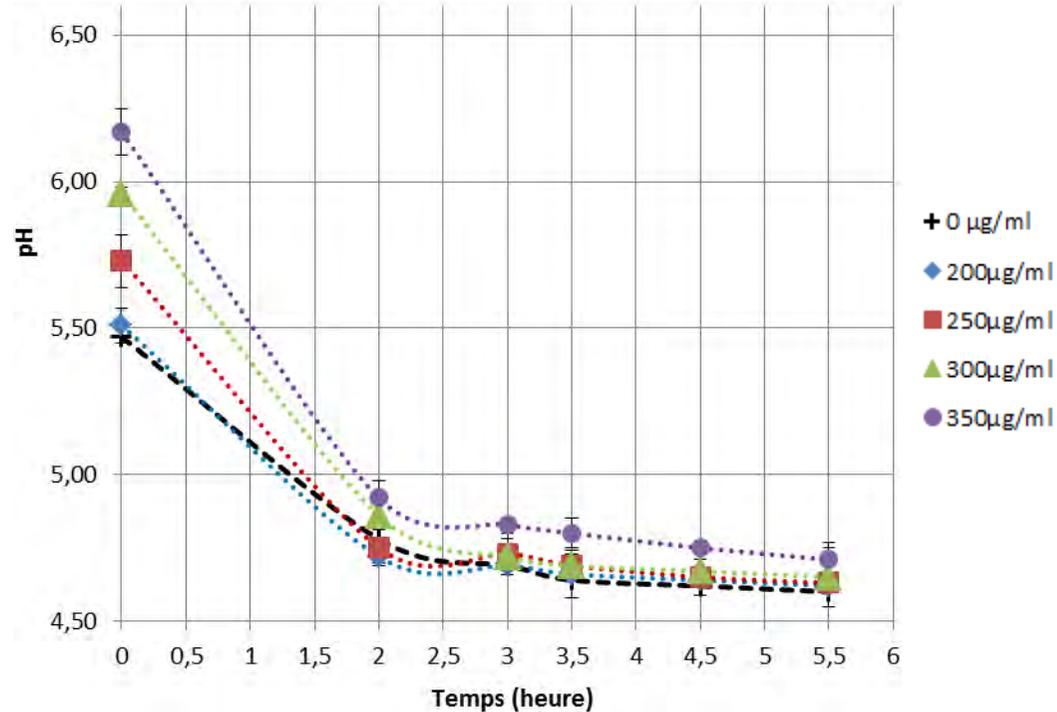


(a) Pen&Strep

Lyofast Y 456 B



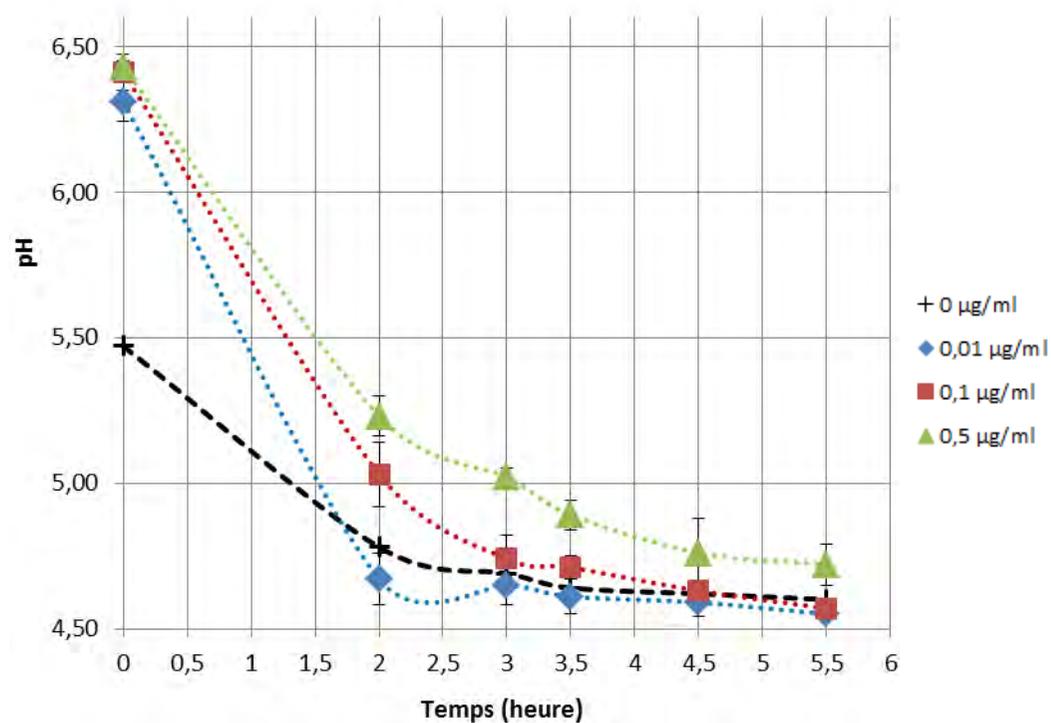
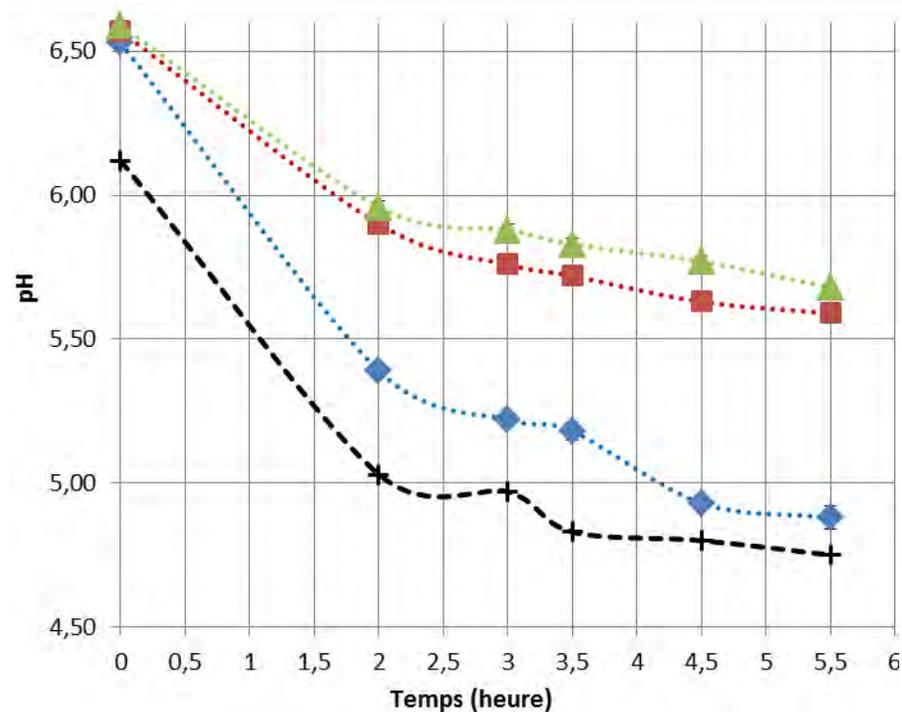
YC-180 Yo-Flex®



(b) Sulfaprim S

Lyofast Y 456 B

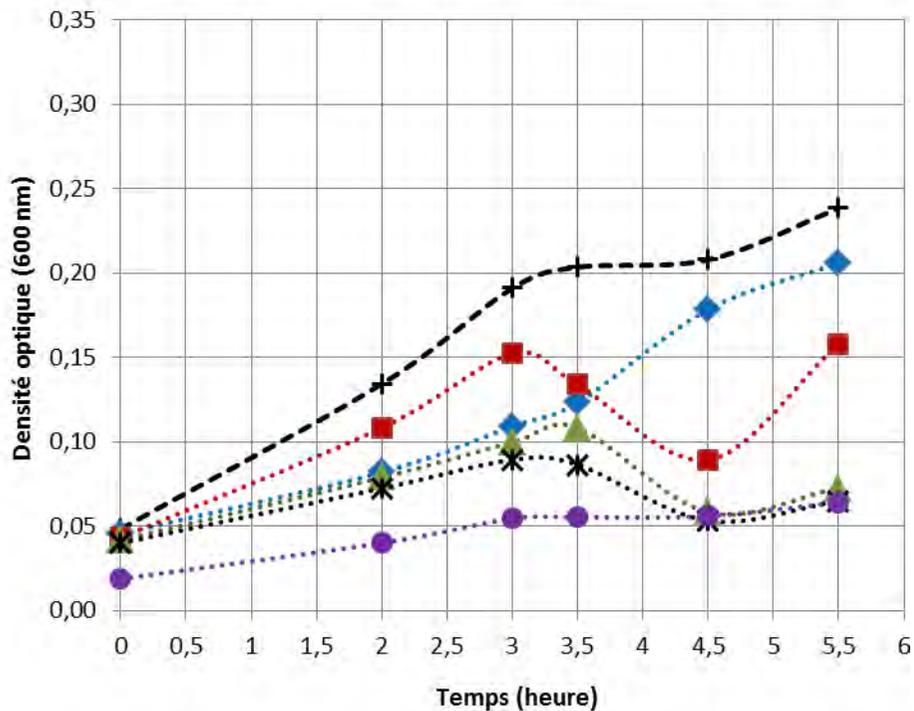
YC-180 Yo-Flex®



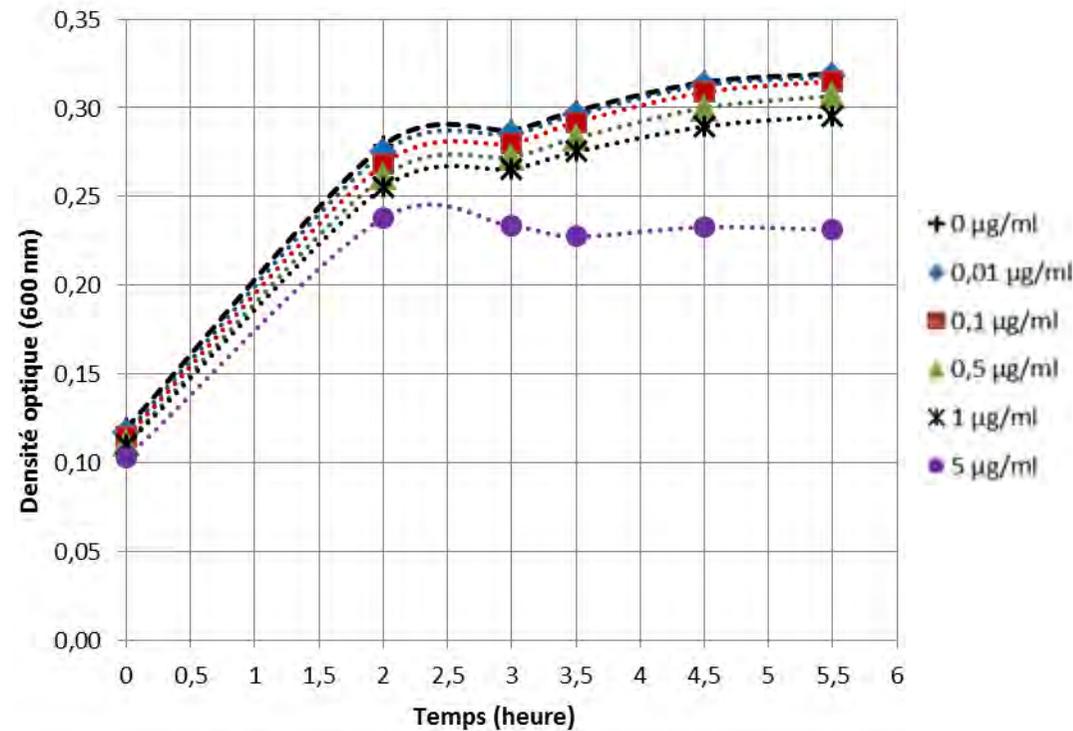
(c) Ampicilline

Figure 16: Cinétique d'acidification des ferments lactiques du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques : (a) Pen&Strep, (b) Sulfaprime S et (c) Ampicilline

Lyofast Y 456 B

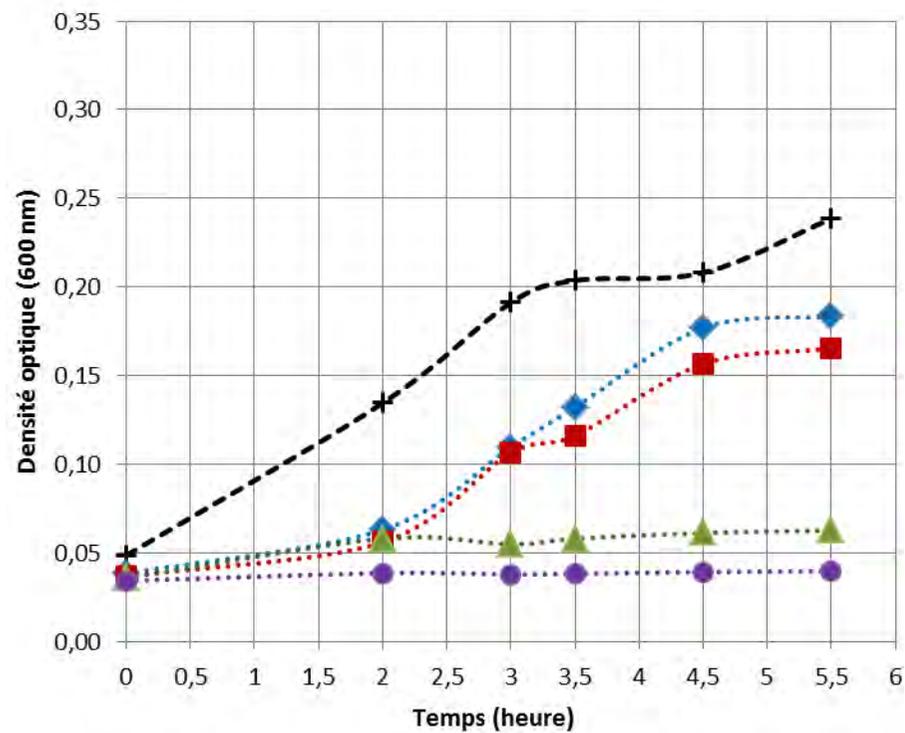


YC-180 Yo-Flex®

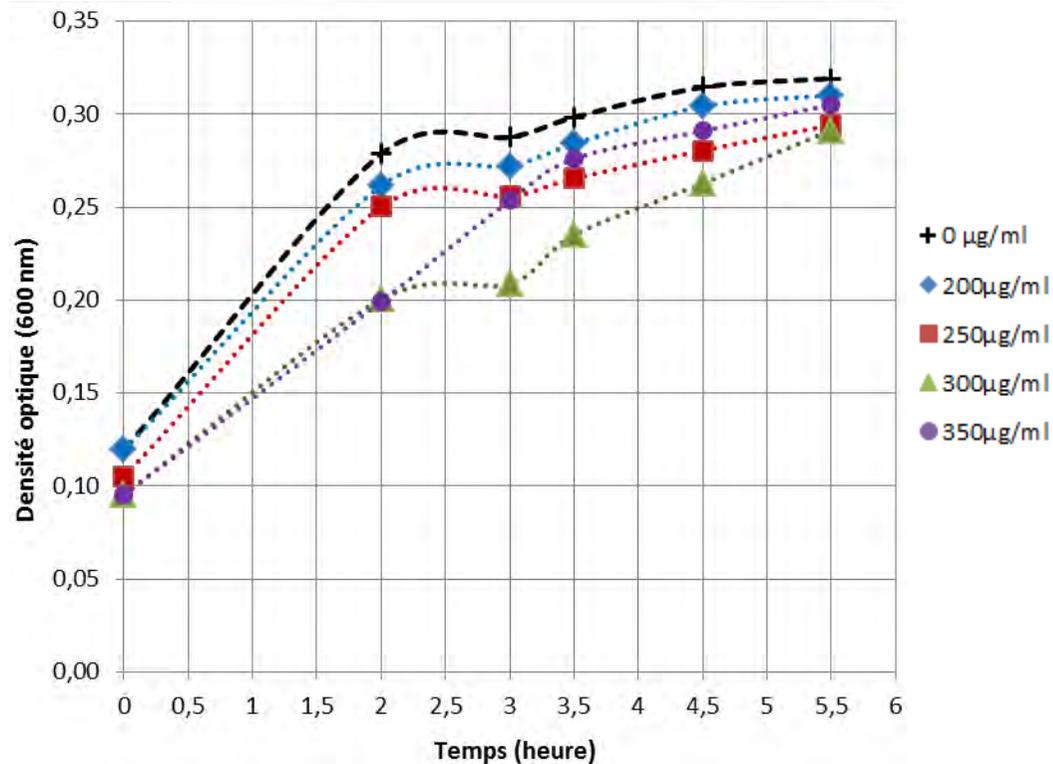


(a) Pen&Strep

Lyofast Y 456 B



YC-180 Yo-Flex®



(b) Sulfaprim S

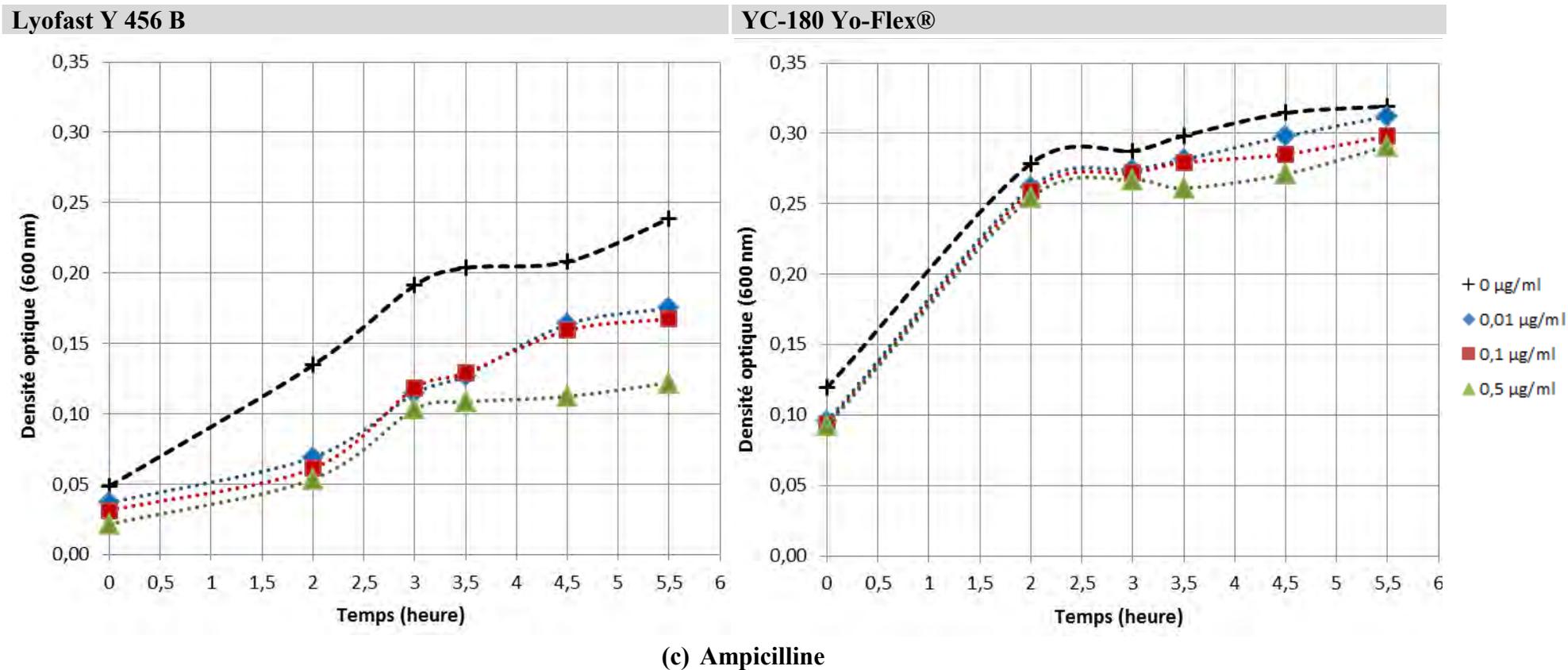
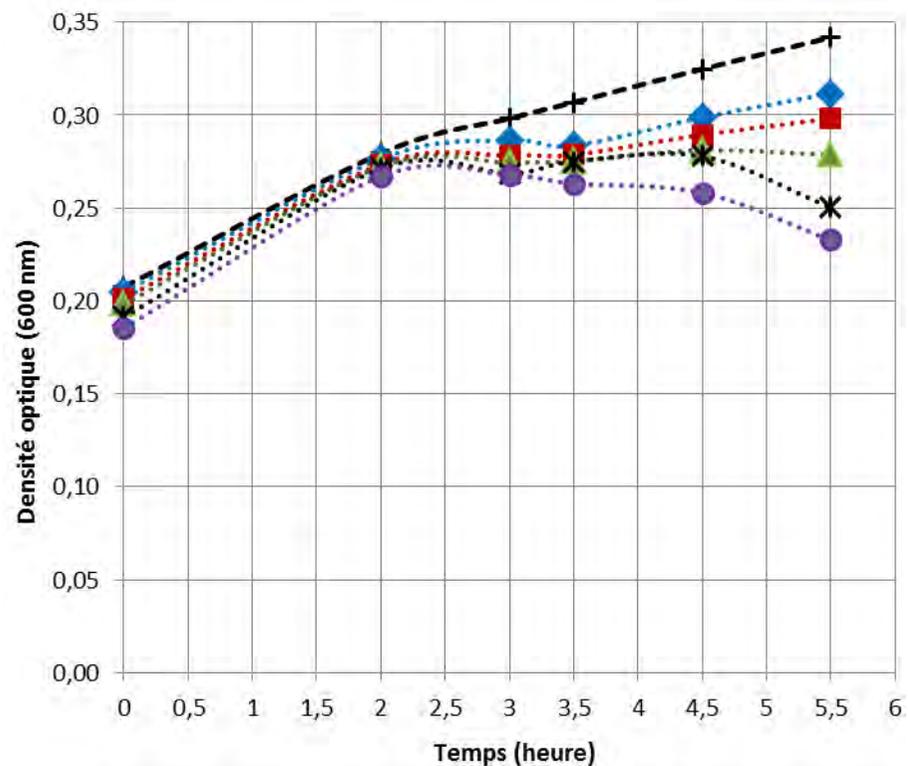
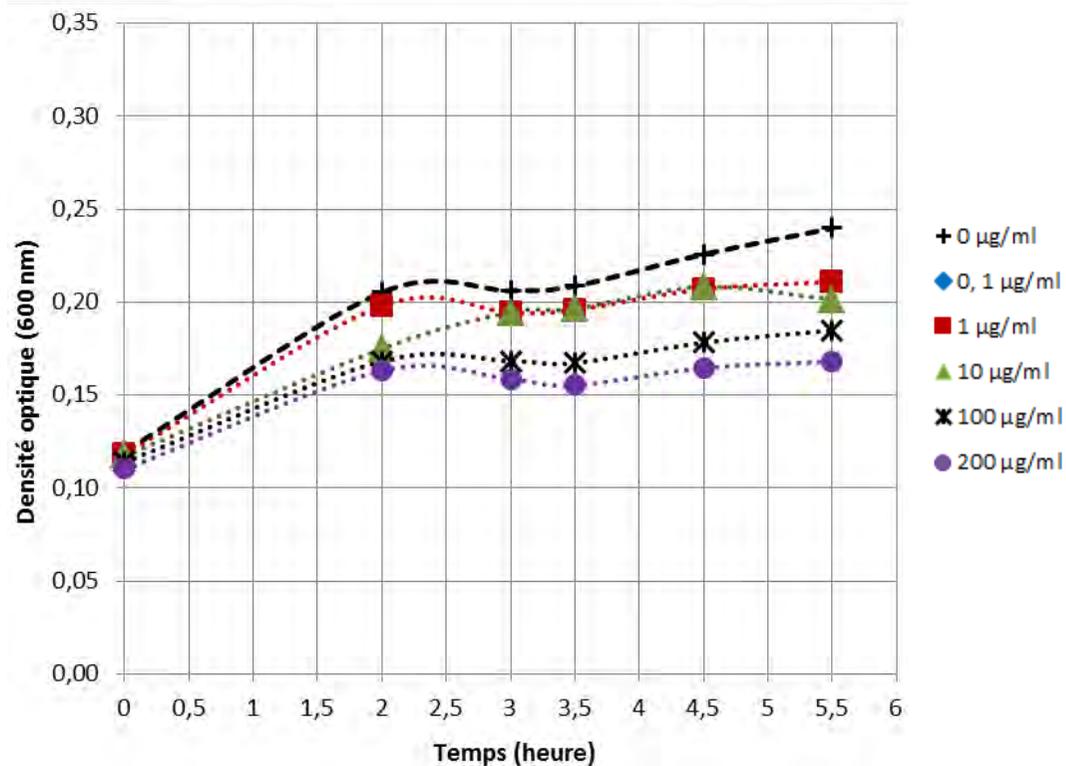


Figure 17: Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques du yaourt (*Lyofast Y 456 B* et *YC-180 Yo-Flex®*) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques : (a) *Pen&Strep*, (b) *Sulfaprime S* et (c) *Ampicilline*

ALPHA 10

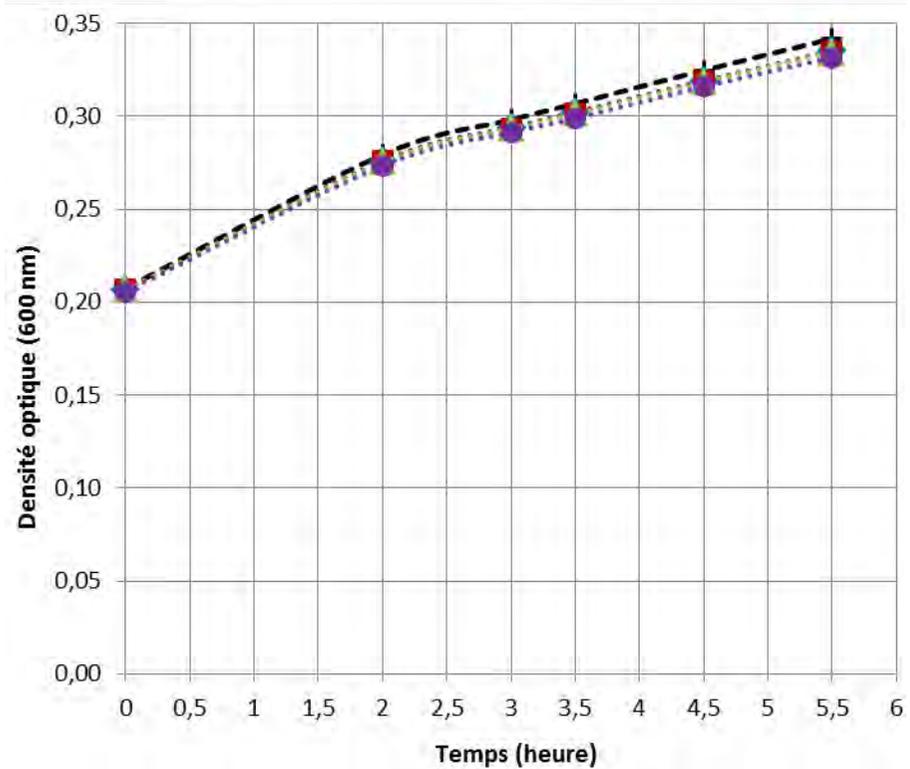


CHN-11

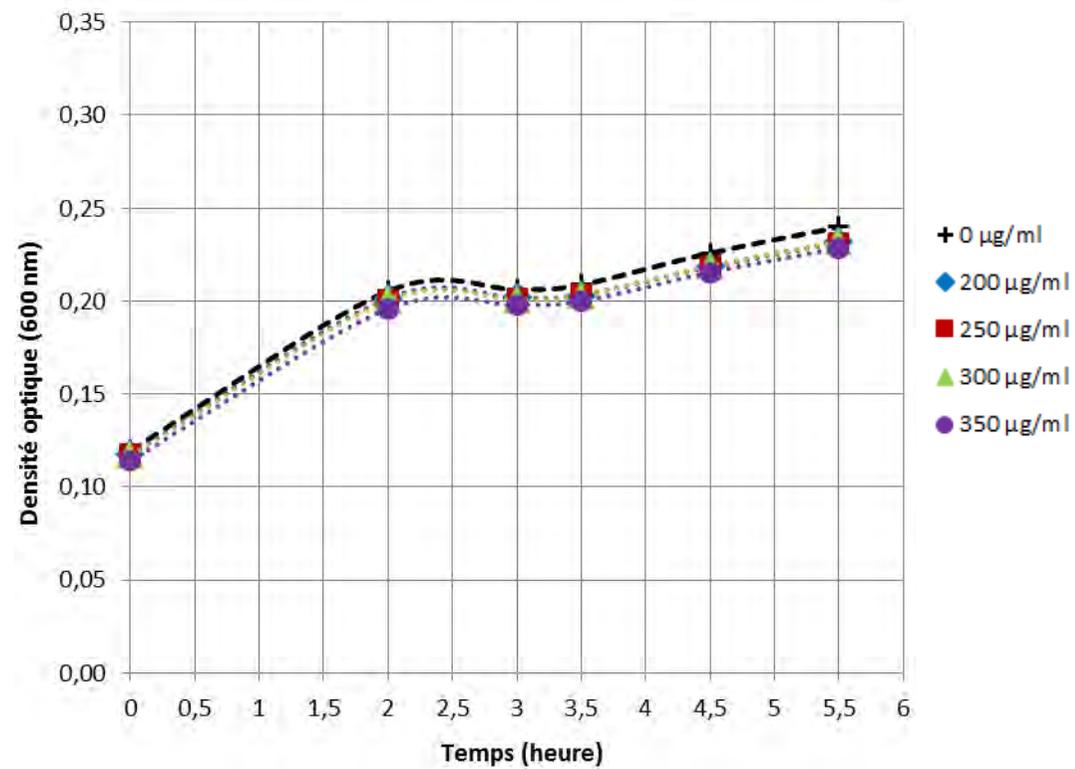


(a) Pen&Strep

ALPHA 10



CHN-11



(b) Sulfaprime S

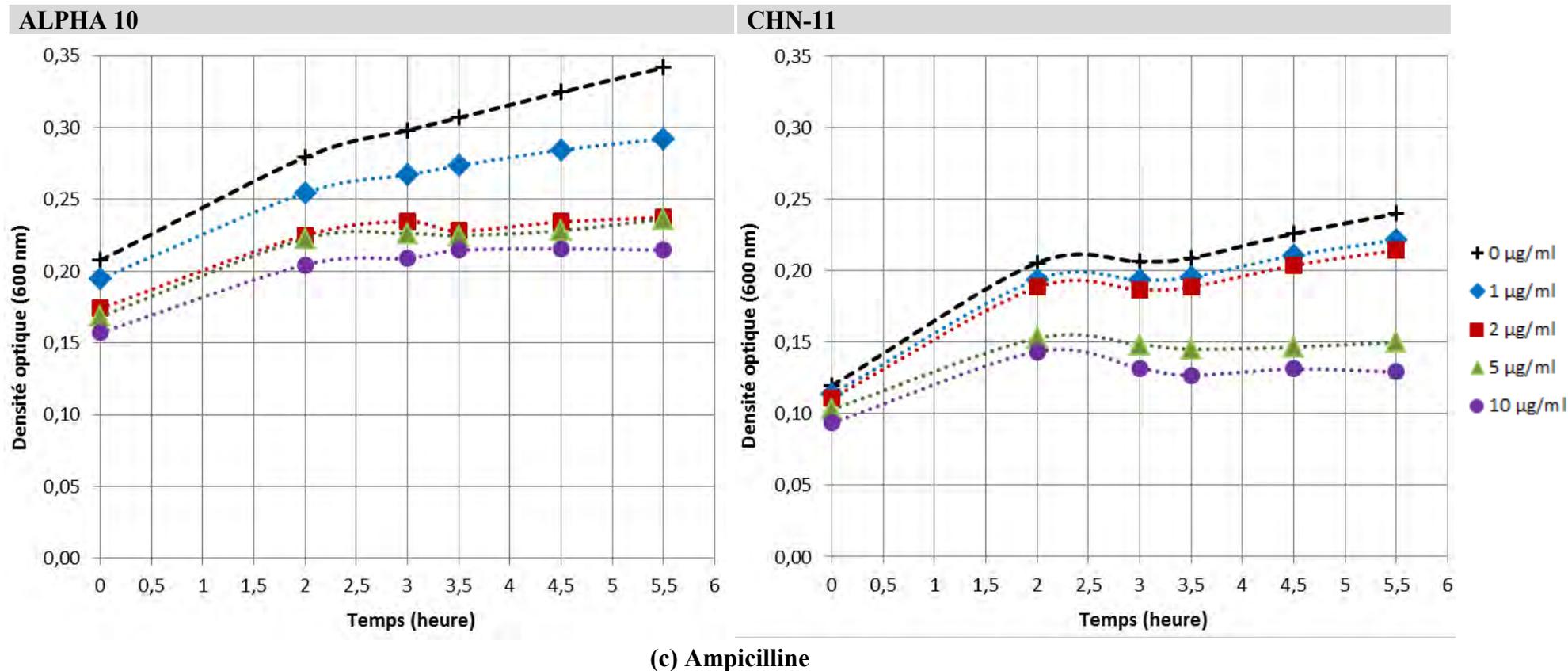


Figure 18 : Cinétique de croissance cellulaire des ferments lactiques utilisés pour la fabrication fromagère (ALPHA 10 et CHN-11) en présence de concentrations croissantes des antibiotiques: (a) Pen&Strep, (b) Sulfaprime S et (c) Ampicilline.

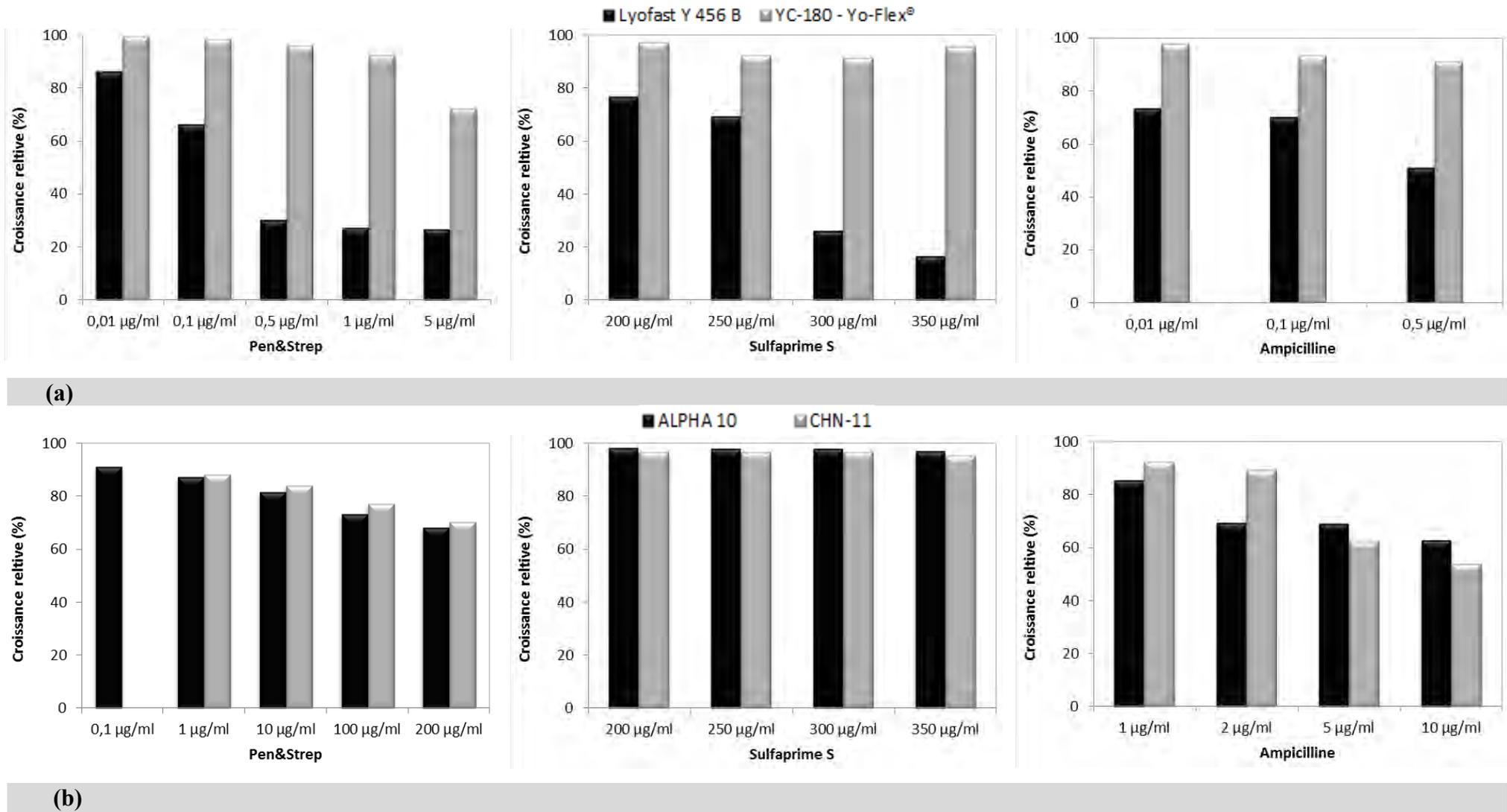


Figure 19: Effet de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprimine S et Ampicilline sur la croissance cellulaire des ferments lactiques au terme de la fermentation (5,5 heures) pour les deux catégories de ferments analysés : (a) ferments du yaourt (Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®) et (b) ferments du fromage (ALPHA 10 et CHN-11). Les valeurs de croissance sont exprimées en référence à la croissance en l'absence des antibiotiques (telle que mesurée par la densité optique à 600 nm).

I.5. Contexte actuel de l'industrie de transformation laitière : une enquête Delphi

I.5.1. Description des répondants

Les entreprises ayant contribué à l'étude se situent dans le Nord-Est algérien (voir Annexe 9.1). Dix entreprises de transformation laitière ont participé à ce travail (voir Annexe 9.2). Toutes les entreprises enquêtées disposent :

- D'un ou plusieurs laboratoires dont les principales fonctions sont le contrôle physico-chimique et microbiologique de la matière première, du produit au cours de fabrication et du produit fini et ;
- Parfois d'un autre laboratoire destiné à poursuivre l'opération du traitement des eaux.

Les chercheurs ayant répondu à notre deuxième questionnaire proviennent de sept universités algériennes (voir Annexe 6). La Figure 20 illustre la composition des experts ayant répondu à l'enquête Delphi.

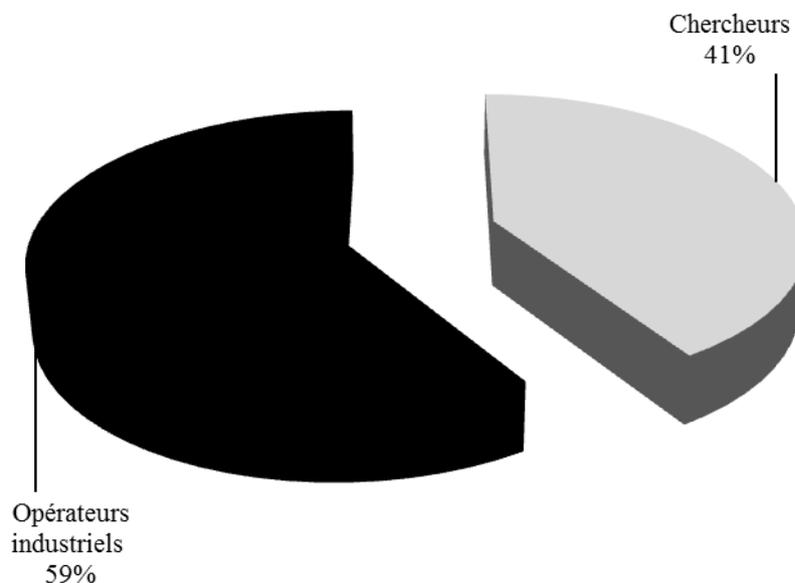


Figure 20 : Composition des experts ayant répondu à l'enquête Delphi

La Figure 21 montre la composition des opérateurs industriels selon leur fonction :

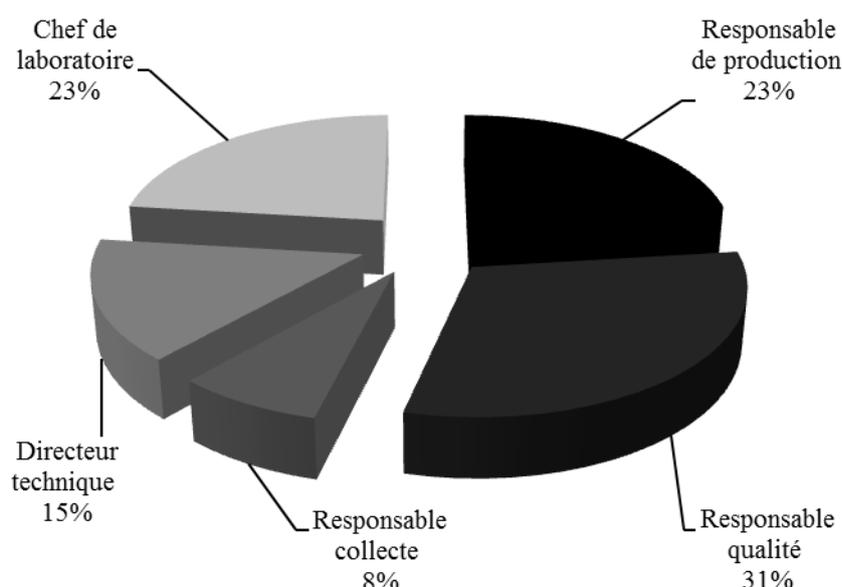


Figure 21 : Distribution des opérateurs industriels selon leur fonction

I.5.2. Résultats de l'enquête Delphi

Depuis une vingtaine d'années, les bactéries lactiques font l'objet de recherche dans plusieurs laboratoires de recherche en Algérie. Le Tableau 27 regroupe des exemples des aspects abordés dans les recherches qui ont été réalisées ou qui sont en cours de réalisation dans les laboratoires nationaux de recherche sur les bactéries lactiques. Ces informations ont été obtenues par le biais d'une recherche dans la littérature scientifique actuelle et les sites Web des universités algériennes en plus des informations qui nous ont été communiquées par les chercheurs lors de manifestations scientifiques auxquelles nous avons participé.

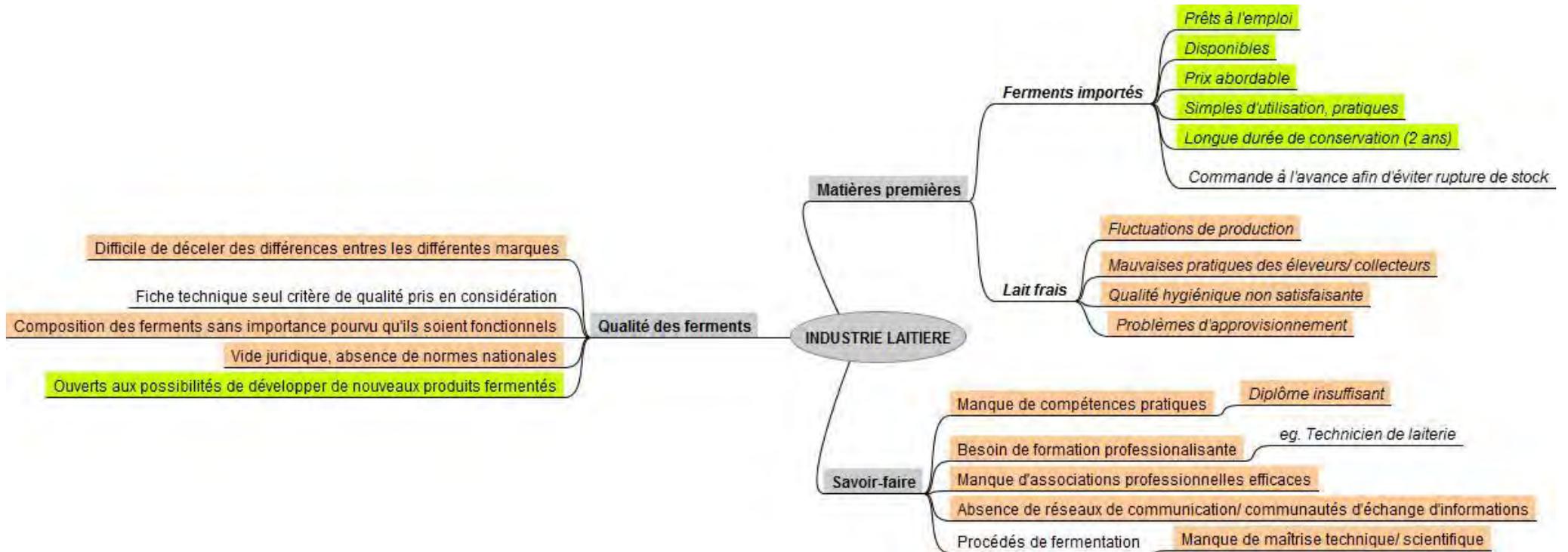
Tableau 27 : Principaux aspects abordés par les chercheurs algériens dans le domaine des bactéries lactiques.

Aspects abordés	Références
- Isolement/ identification/ physiologie.	Karam H.Z. et Karam N.E. (2006)
- Ecologie des bactéries lactiques/ interactions.	Idoui T. (2009)
- Caractères technologiques (eg. pouvoir acidifiant, protéolytique ou pectinolytique, lysotypie, antibiorésistance, tolérance à NaCl).	Bekhouche et Boulahrouf (2005)
- Production de bactériocines.	Metlef S. et Dilmi Bouras A. (2009)
- Recherche de souches probiotiques.	Allouche F. N., Hellal A., Laraba A., (2010)
- Etude de variabilité génétique.	Tabak S. et Bensoltane A. (2011)
- Essai d'élaboration de ferments mésophiles ou thermophiles stables et performants.	Ghazi F.Z., Aggad H., Guessas B., Henni D., et Kihal M. (2006)
- Constitution de collections de bactéries lactiques.	Roudj S., Belkheir K., Karam H.Z. et Karam N.E. (2009)
- Essais à l'échelle pilote de fabrications laitières (yaourt, camembert...etc.).	Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D.E. et Kihal M. (2005)
- Utilisation des bactéries lactiques comme additifs dans la ration des animaux d'élevage.	Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R. (2005)

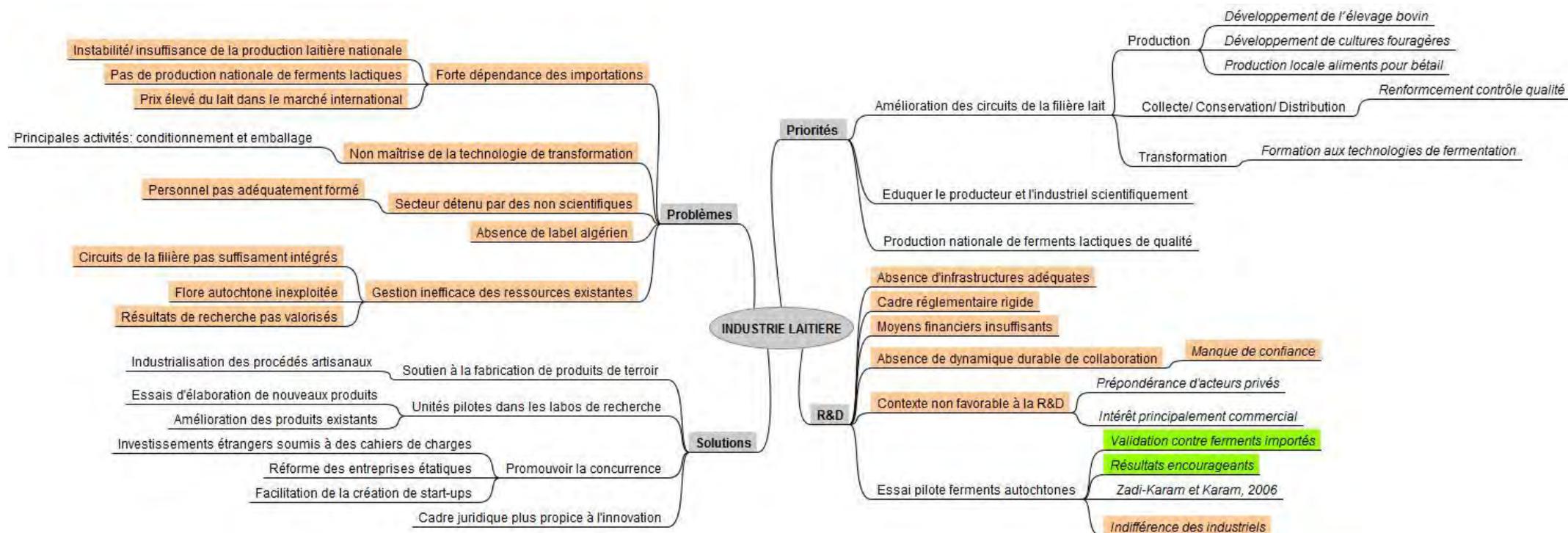
1.5.2.1. Etat des lieux de l'industrie laitière algérienne

Les opinions recueillies des experts (industriels et chercheurs) par rapport au contexte actuel de l'industrie laitière sont illustrées par la carte heuristique de la Figure 22(a) – (b). Il ressort de la Figure 22(a) que les opérateurs industriels ont des perceptions plutôt négatives du savoir-faire technique local, notamment en matière de technologie de fermentation et le manque d'associations et réseaux professionnels favorisant le partage des informations et connaissances dans le domaine de la transformation laitière. Concernant la disponibilité et la qualité des matières premières, les opérateurs industriels ont exprimé des opinions favorables par rapport aux ferments lactiques importés. Par contre, beaucoup de problèmes persistent par rapport au lait frais. Les fluctuations dans la production et la mauvaise qualité hygiénique sont parmi les principaux problèmes cités. Nous avons constaté que les opérateurs industriels sont conscients du vide juridique en matière de ferments lactiques. Il leur est souvent difficile, voire impossible, de déceler les différences en termes de performance entre différentes marques de ferments. Nous avons également noté que les opérateurs industriels sont ouverts à la possibilité de développement de nouveaux produits fermentés.

La Figure 22(b) illustre les opinions des chercheurs par rapport au contexte actuel de l'industrie laitière nationale. Les résultats recueillis démontrent que la communauté scientifique, représentée par l'échantillon des chercheurs ayant répondu à notre questionnaire, déplore principalement le manque de confiance et de dynamique de collaboration durable entre le secteur industriel et la recherche scientifique. Plusieurs contraintes structurelles contribuent à cette situation, notamment le cadre réglementaire rigide ayant trait à la recherche scientifique et le manque d'infrastructures adéquates pour les essais pilotes et validation de nouveaux ferments. Le manque de représentativité des scientifiques dans la filière lait représente une autre cause qui, selon les répondants, tendrait à défavoriser la communication intersectorielle nécessaire pour l'élaboration de collaborations fructueuses et durables. Un autre concept principal qui ressort des résultats recueillis auprès des chercheurs est la nécessité de protéger et bien exploiter les ressources locales, notamment la biodiversité microbienne endémique, et de développer les compétences nationales en matière de technologie des fermentations microbiennes afin de réduire la dépendance des matières premières et savoir-faire importés et mieux maîtriser la chaîne de l'assurance qualité des produits laitiers.



(a)



(b)

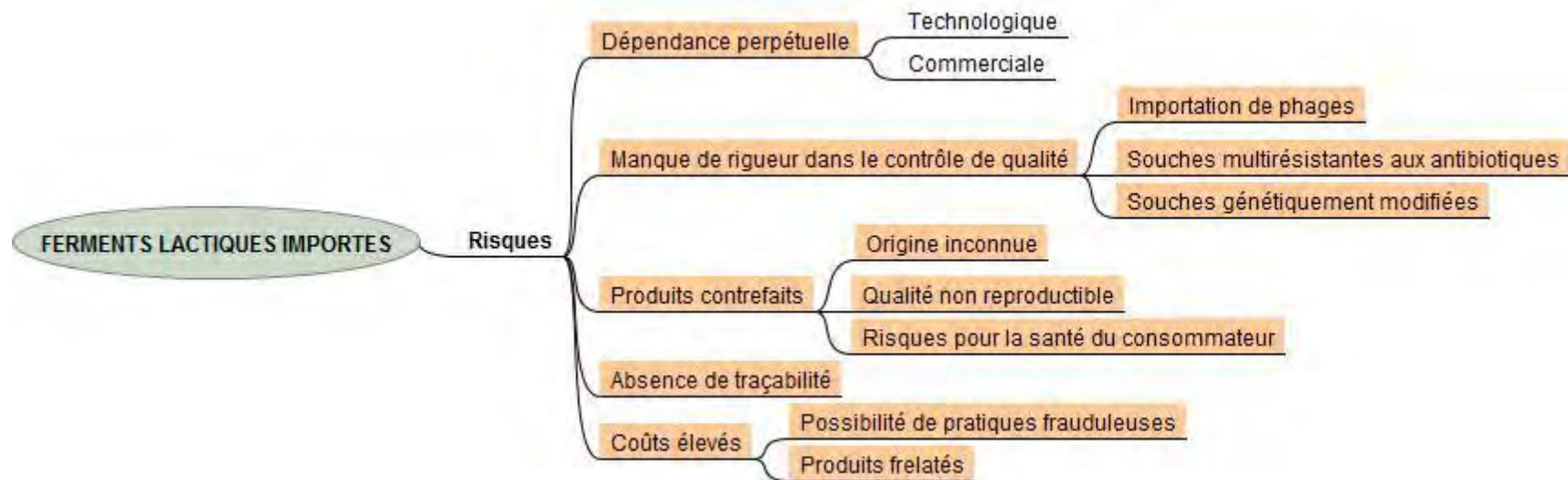
Clé de la carte : couleur verte = connotation positive ; couleur rouge = connotation négative ; couleur bleue = propositions/ constats

Figure 22 : Carte heuristique représentant les résultats de l'enquête réalisée auprès des : (a) opérateurs industriels et (b) chercheurs algériens dans le domaine des bactéries lactiques. Ces idées représentent les opinions des experts enquêtés par rapport au contexte actuel de l'industrie laitière nationale.

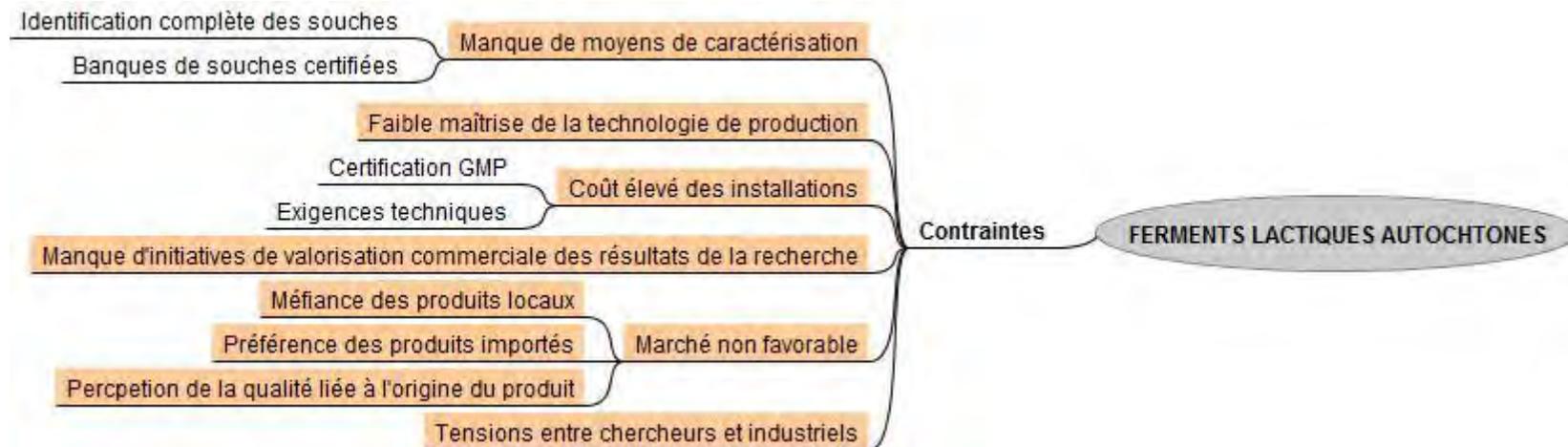
1.5.2.2. Contraintes et perspectives pour le développement de ferments lactiques

La Figure 23 illustre, sous forme d'une carte heuristique, les opinions recueillies auprès des chercheurs ayant répondu à notre questionnaire concernant les risques associés aux ferments lactiques importés et les perspectives de développement de ferments lactiques locaux. Bien que les industriels se soient prononcés en faveur des ferments importés en raison de leurs avantages pratiques (voir Figure 22 (a)), les chercheurs ont soulevé plusieurs risques qui y sont associés, tels que perçus par la communauté scientifique. Outre les risques d'ordre économique tels que la dépendance perpétuelle des importations et le risque des produits frelatés ou contrefaits, les ferments lactiques importés représentent également un risque pour l'environnement et la santé publique. En effet, en l'absence d'un cadre réglementaire national rigoureux quant à l'évaluation de leur qualité, ces ferments pourraient constituer des vecteurs pour l'importation de gènes responsables de la résistance à différents antibiotiques, des organismes génétiquement modifiés et/ ou des phages.

Concernant les perspectives de développement de ferments lactiques locaux, les opinions des chercheurs sondés convergent sur le fait que le développement de tels produits est tributaire de plusieurs facteurs dont la disponibilité et la maîtrise des outils scientifiques et technologiques de caractérisation des souches (*ex.* élaboration de cartes génétiques, mise en place de banques de souches certifiées), la formation de main d'œuvre compétente notamment dans le domaine des technologies de fermentation microbienne, la mise en place d'infrastructures appropriées pour la fabrication de ferments commerciaux (*ex.* certification GMP), la mise en œuvre d'outils réglementaires favorisant la collaboration entre l'industrie et les scientifiques notamment en matière de recherche et de développement.



(a)



(b)

Figure 23: Carte heuristique représentant les opinions des chercheurs concernant : (a) les risques associés aux ferments lactiques importés et (b) les contraintes faisant face au développement de ferments lactiques autochtones.

1.5.2.3. Opinions sur les ferments lactiques génétiquement modifiés

Les avis des chercheurs interrogés divergent entre deux groupes : le premier groupe a émis des opinions favorables au développement et utilisation des ferments lactiques génétiquement modifiés dans l'industrie de transformation laitière, le deuxième groupe a exprimé des réserves quant à cette éventualité et certains membres de ce groupe l'ont catégoriquement rejetée. Les arguments recueillis des deux groupes sont résumés dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Opinions des chercheurs enquêtés sur les ferments lactiques génétiquement modifiés.

	Chercheurs pour les ferments génétiquement modifiés	Chercheurs contre les ferments génétiquement modifiés
Effectif	(2/9)	(7/9)
Arguments présentés	<ul style="list-style-type: none"> - Certains gènes codent des caractères technologiques désirables (<i>ex.</i> acidification, protéolyse, production de composés aromatiques, polysaccharides et de bactériocines). Ces modifications permettraient d'obtenir un lait fermenté stable et qui empêche la prolifération des germes indésirables et les germes d'altération. - Les ferments génétiquement modifiés pourraient présenter des avantages économiques (coûts moins élevés). 	<ul style="list-style-type: none"> - La stabilité génétique de ce type de ferments n'est pas assurée (<i>ex.</i> risque de mutations, transfert de gènes... <i>etc.</i>). - Ce type de ferments pourrait camoufler une fraude, par exemple : un ferment comprenant une souche antibiorésistante pourra fermenter un lait frelaté stabilisé d'une éventuelle altération par ajout d'antibiotiques. - Perspectives commerciales réduites en raison de la méfiance, voire même le rejet, de cette technologie du point de vue des consommateurs qui préfèrent les produits naturels et traditionnels. - Risque de voir apparaître des bouleversements écologiques de la flore du tube digestif se traduisant dans un second temps par des effets nocifs pour l'hôte. - Manque de compétences scientifiques (<i>ex.</i> expérimentation <i>in vivo</i>) et cadres réglementaires internationaux pertinents à l'analyse des risques associés aux microorganismes génétiquement modifiés destinés à la consommation humaine.

II) DISCUSSION

II.1.Principaux constats

II.1.1. Qualité microbiologique des ferments analysés

Selon l'Arrêté du 27 mars 2004 publié dans le JORA n° 32 du 23 mai 2004, les organismes de contamination sont constitués par tout micro-organisme autre que ceux responsables de la fermentation spécifique du type de lait fermenté considéré. Nos résultats démontrent que tous les échantillons de ferments analysés sont conformes aux exigences réglementaires internationales en matière de qualité microbiologique (voir Tableau 10) ce qui correspond aux normes ISO résumées dans le Tableau 29.

Tableau 29 : Exigences réglementaires internationales en matière de qualité microbiologique des ferments lactiques

Indicateur microbiologique	Référence
Coliformes	ISO 11866 -1-2/ IDF 170 -1-2
Salmonelles	ISO 6785/IDF93
<i>Staphylococcus aureus</i>	ISO 6888-1-2
<i>Entérobacteriaceae</i>	ISO 215281-2
<i>Champignons</i>	ISO 6611/IDF 94

Nous avons constaté que les fiches techniques accompagnant certains ferments importés ne donnent aucune spécification sur la norme de dénombrement des entérocoques dans ces ferments. Par exemple, pour le ferment SALSA 1, nos résultats ont révélé 3 767 germes/ g de ferment réhydraté (lait fermenté inoculé à raison de 1 g / 100 ml). Ce ferment apparemment de mauvaise qualité ne l'est pas réellement, puisque le nombre important de la FTAM contient en majorité des bactéries de la souche LX. Cette souche a démontré une grande aptitude à se développer sur différents milieux de culture, sa croissance est très rapide sur MRS, M17 ainsi que la gélose PCA, sa capacité à coloniser divers environnements est probablement due à son aptitude à former des biofilms (**Planchon et al., 2009**). En revanche, d'autres souches caractérisées dans notre analyse, surtout les lactobacilles tels que LH2, ont une viabilité limitée. Nous avons constaté que même par conservation sur milieu approprié, en faisant un repiquage pour réaliser un test de caractérisation, la viabilité était limitée et les colonies poussaient difficilement. La viabilité des souches composant les ferments lactiques a une influence majeure sur la conduite de la fermentation (acidification et coagulation). Nos résultats pourraient contribuer à expliquer la qualité variable des produits laitiers fermentés disponibles sur le marché et qui varie d'un producteur à un autre et, parfois, d'un lot à un autre au sein d'une même unité de production.

Certains producteurs déclarent dans les fiches accompagnant les ferments lactiques que ceux-ci ne contiennent pas d'organismes génétiquement modifiés ni d'éléments génétiquement modifiés selon les **directive européenne 90/220/EEC, (EC) N° 1829/2003** et la réglementation **(EC) N° 1830/2003**. Cependant, nous n'avons pas vérifié ces données en raison du manque de moyens. L'identité des souches présentes dans les ferments, notamment les mélanges non caractérisés, a été vérifiée par des méthodes classiques et nos résultats sont conformes aux informations indiquées sur la fiche technique accompagnant le ferment Lyofast Y 456 B. Les autres ferments nous ont été fournis sans fiches techniques. Pour cette raison, l'identité des souches caractérisées dans notre étude nécessite d'être confirmée par PCR pour vu le manque de fiabilité des méthodes classiques quant à l'identification des micro-organismes.

II.1.2. Comparaison des profils d'acidification des ferments étudiés avec les fiches techniques

II.1.2.1. Ferments du yaourt

En ce qui concerne les ferments du yaourt Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex®, nous avons constaté que la fermentation des témoins (en l'absence d'antibiotiques) est conforme aux profils attendus lors des fermentations industrielles (voir Figure 24). Le pH atteint la valeur de 4,5 approximativement après 6 heures de fermentation. Cependant, nous n'avons pas pu observer la phase de latence dans nos résultats (voir Figure 13) en raison du manque de points d'échantillonnage durant les deux premières heures de fermentation.

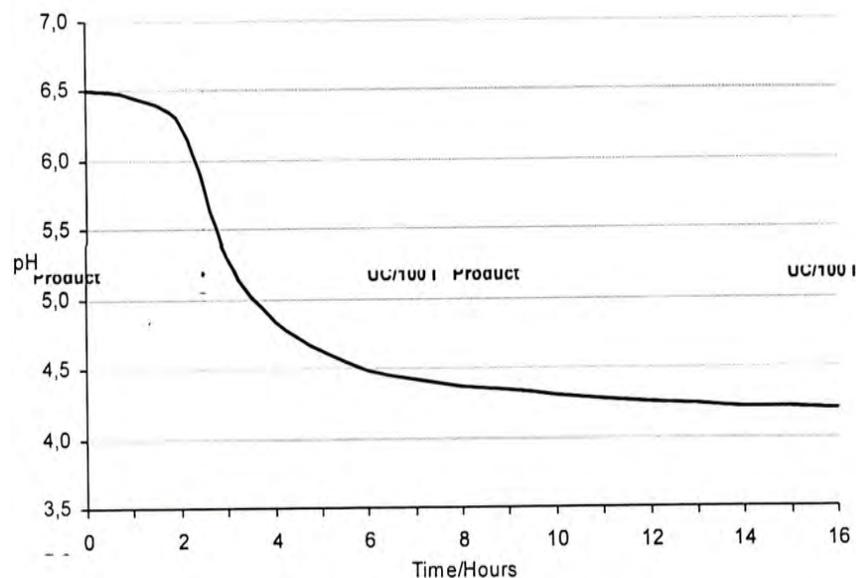


Figure 24 : Profil d'acidification de lait inoculé par le ferment Lyofast Y 330 A à l'échelle industrielle (Source : Fiche technique accompagnant le ferment Lyofast Y 330 A pour yaourt).

Au cours du suivi de la fermentation des ferments YC-180 Yo-Flex® et Lyofast Y 456 B, les profils d'acidification des deux ferments sont légèrement différents. Ceci pourrait être dû à la composition de chaque mélange (*i.e.* le rapport entre les souches *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*). Le pH est abaissé sous l'effet de la production d'acide lactique par les deux souches contenues dans les ferments industriels. La température d'incubation était de 42°C environ, ce qui est favorable à une meilleure multiplication de *Streptococcus thermophilus* favorisant ainsi la production d'arôme. Une légère augmentation de la température d'incubation (45°C-46°C) aurait favorisé la multiplication de *Lactobacillus bulgaricus*, donc la production d'acide lactique (**Boubchir-Ladj, 2010**). C'est ainsi que les unités de production laitière orientent les caractéristiques du yaourt désiré selon les préférences des consommateurs. Un pH supérieur à 4,4 est bien favorable à la viabilité des souches et le bon fonctionnement de leurs propriétés probiotiques afin de mieux accomplir leurs fonctions bénéfiques pour la santé (**Smith et Charter, 2010**).

La législation sur le pH final du yaourt diffère selon les pays (**Corrieu et Luquet, 2005**). Beaucoup de pays expriment l'acidité du yaourt directement par le pH final (pH < 4,6 pour l'Espagne, pH < 4,5 pour les Pays-Bas, l'Australie et le Mexique), d'autres pays définissent l'acidité du yaourt en termes de pourcentage exprimé en acide lactique (< 0,7% pour la Belgique, < 0,8% pour le Canada et < 0,9% pour les Etats-Unis) ou par gramme d'acide lactique par 100 grammes de produit (> 0,7 pour la France, le Portugal et l'Italie, 0,8 pour la Tunisie) (**Corrieu et Luquet, 2005**). L'Algérie n'a pas de réglementation nationale concernant la quantité d'acide lactique ou le pH du yaourt.

II.1.2.2. Ferments du fromage

Les cinétiques d'acidification des ferments du fromage ALPHA 10 et CHN-11 en l'absence d'antibiotiques sont comparables aux profils attendus à l'échelle industrielle. La Figure 24 montre le profil fermentaire du lait inoculé par le ferment CHN-11 à différentes températures de fermentation.

Nos expérimentations avec les ferments du fromage ont été réalisées à 30°C, ce qui constitue une température favorable pour la production d'acide en comparaison avec les températures supérieures ou inférieures (Figure 25).

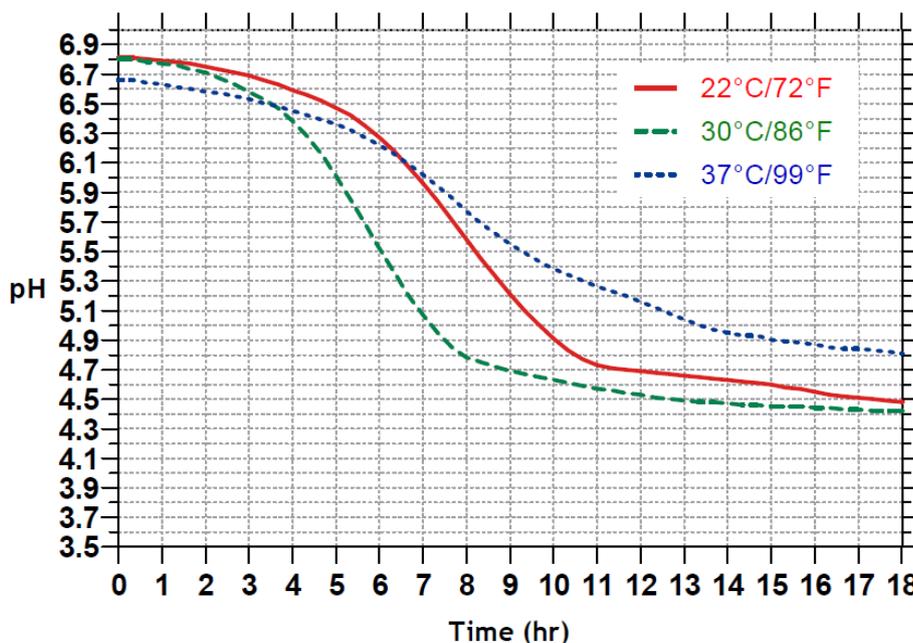


Figure 25 : Profil d'acidification du ferment CHN-11 à l'échelle industrielle

(Source : <http://www.chr-hansen.com/products/product-areas/dairy-cultures/cultures-for-cheese.html>)

II.1.3. Évaluation de la susceptibilité des ferments lactiques aux antibiotiques utilisés dans la production laitière

Nous avons évalué l'effet de concentrations croissantes des antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprimine S et Ampicilline sur le pouvoir acidifiant et la cinétique de croissance de deux catégories de ferments lactiques : les ferments utilisés pour la fabrication du yaourt (Lyofast Y 456 et YC-180 - Yo-Flex®) et les ferments utilisés pour la fabrication du fromage (ALPHA 10, CHN-11).

Les antibiotiques utilisés dans cette étude appartiennent à différentes familles :

- La Pen&Strep est une association efficace de la Pénicilline et la Streptomycine (famille d'aminosides). En plus de l'action précitée des pénicillines, la recombinaison avec la streptomycine devient encore plus forte car ce dernier antibiotique a une action spécifique contre les bacilles Gram - (**Jean-noel et Guy, 2006 ; Yala et al., 2001**). En plus de l'action connue de la Pénicilline, la Streptomycine bloque le canal du ribosome et arrête ainsi la synthèse des protéines ;
- La Sulfaprimine S (famille des Sulfamides) a un spectre d'action large (**Jean-Noel et Guy, 2006**);
- L'Ampicilline fait partie du groupe des pénicillines de la famille des Bêta lactamines ayant une activité démontrée contre les coques Gram + et Gram - et les bacilles Gram + (**Yala et al.,**

2001). Son action est attribuable à l'inhibition de la biosynthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne pendant la phase de multiplication active.

Nos résultats démontrent que l'effet de l'antibiotique sur le profil d'acidification et la cinétique de croissance varie d'un antibiotique à un autre et est relatif à la dose de l'antibiotique utilisée pour chaque cas étudié.

II.1.3.1. Effet des antibiotiques testés sur les profils d'acidification

Nous nous sommes limités à l'étude des ferments du yaourt Lyofast Y 456 B et YC-180 Yo-Flex® suite à un problème rencontré avec le pH-mètre. La présence des antibiotiques affecte négativement la production de l'acide lactique par les ferments en question : plus la concentration de l'antibiotique dans le milieu est importante, plus il y a diminution de l'acidification.

Le Tableau 30 résume l'effet des différentes doses d'antibiotiques testés sur la valeur du pH final par rapport à la valeur initiale obtenue en l'absence des antibiotiques. Nous constatons que, contrairement au ferment Lyofast Y 456 B, le ferment YC-180 Yo-Flex® produit des valeurs de pH final comparables avec celles obtenues en l'absence des antibiotiques et ce pour toutes les gammes de concentrations et d'antibiotiques testés.

Stoltz et Hankinson (1952) ont trouvé qu'au bout de 4 heures de fermentation et en présence d'une combinaison de 1,0 unité de pénicilline avec 5,0 mg/ml de Streptomycine le pH s'est légèrement abaissé jusqu'à donner la valeur de 6,18. Dans notre étude, en présence de la Pen&Strep, nous avons obtenu des valeurs de pH de 6,15 et 6,14 au bout de 3,5 et 4,5 heures respectivement avec le ferment Lyofast Y 456 B avec une dose de 5 µl/ml, tandis que le ferment YC-180 Yo-Flex® s'est avéré plus performant à cette même dose et a produit un pH de 5,78 au bout de 4,5 heures de fermentation. Cette différence indique l'importance de la résistance des souches composant les ferments lactiques industriels pour influencer la production d'acide par chaque souche.

Nous avons constaté que le pH peut diminuer même en présence de doses importantes d'antibiotiques (cas de la Sulfaprime S). Ceci pourrait résulter en la coagulation du lait même en présence de doses variables d'antibiotiques étudiés et donc contribuer à dissimuler les fraudes (*i.e.* laits frelatés). En outre, la résistance des souches des ferments utilisés dans les produits laitiers fermentés aux différents antibiotiques pourrait poser un risque pour la santé humaine, en cas de transmission de gènes responsables de cette résistance depuis les ferments à l'homme.

Tableau 30 : Effet des différentes doses d'antibiotiques testés sur la production de l'acide lactique par les ferments lactiques du yaourt.

Antibiotique	Changement du pH final*											
	Pen&Strep					Sulfaprime S				Ampicilline		
Dose (µg/ ml)	0,01	0,1	0,5	1	5	200	250	300	350	0,01	0,1	0,5
YC-180 Yo-Flex®	+0,05	+0,22	+0,24	+0,26	+1,14	+0,02	+0,03	+0,05	+0,11	-0,05	-0,07	+0,12
Lyofast Y 456 B	+0,12	+0,63	+0,71	+0,74	+1,39	+0,13	+0,11	+0,70	+1,69	+0,13	+0,84	+0,93

*Relativement au pH final obtenu en l'absence des antibiotiques [= $pH_{ATB} - pH_{témoin}$]

II.1.3.2. Effet des antibiotiques testés sur la cinétique de croissance cellulaire

Nos résultats démontrent une diminution de la croissance cellulaire avec l'augmentation de la dose d'antibiotique introduite au milieu de fermentation : plus on prolonge le temps de fermentation, et par conséquent le temps de contact des cellules avec l'antibiotique, plus la croissance diminue. Les mécanismes d'action des antibiotiques varient selon les propriétés de chaque antibiotique, toutefois le résultat ultime est l'inhibition de la croissance cellulaire.

Les Figures 16 – 17 indiquent que pour les concentrations les plus faibles des antibiotiques testés, le premier contact avec les antibiotiques stresse les cellules bactériennes résultant en une diminution de la rapidité initiale de croissance et la biomasse produite (par rapport aux témoins). Cependant, nos résultats démontrent que les cellules bactériennes s'adaptent au cours de la fermentation et reprennent leur croissance. Les concentrations supérieures des antibiotiques testés ont résulté en une diminution plus prononcée de la croissance et parfois en l'inhibition totale de celle-ci comme le dans le cas du ferment Lyofast Y 456 B en présence de 300 – 350 µg/ml de Sulfaprime S (voir Figure 16(b)). Nos résultats comparent favorablement avec l'étude de **Stoltz et Hankinson** dont les résultats observés dans une population de 6×10^6 bactéries lactiques/ ml, en utilisant l'association Pénicilline-Streptomycine (à raison de 0,01 unité de Pénicilline et 0,1 mg/ml de Streptomycine), montrent une diminution initiale de la croissance cellulaire suivie par une récupération de celle-ci ($3,2 \times 10^7$ cellules bactériennes/ ml). En revanche, une concentration plus importante des mêmes antibiotiques (1,0 unité de Pénicilline associé à 5,0 mg/ml de Streptomycine) résulta en une diminution irréversible de la population bactérienne (**Stoltz et Hankinson, 1952**).

Les bactéries lactiques se comportent différemment en présence des antibiotiques, trois cas de figures sont possibles comme le résume le Tableau 31.

Tableau 31 : Susceptibilité des bactéries lactiques aux antibiotiques (d'Aimmo et al., 2007).

Susceptibles	Modérément résistants	Résistants
CMI < 8 µg/ml	CMI ≥ 8 µg/ml	CMI > 32 µg/ml

Nous avons utilisé la classification du Tableau 31 pour évaluer la susceptibilité des ferments analysés dans notre étude par rapport aux antibiotiques testés (voir Tableau 32). Cependant, notre classification est à titre indicatif puisque nos résultats ont été obtenus à partir de mélanges de souches et non de souches purifiées.

Tableau 32 : Définition des CMI des différents antibiotiques vis-à-vis les ferments lactiques testés au bout 5,5 heures de fermentation

Antibiotique	Ferments lactiques	CMI (µl/ml)	Profil de résistance
Pen&Strep	YC-180 Yo-Flex®	> 5	Sensible à modérément résistant
	Lyofast Y 456 B	0,1 < CMI _{50%} * < 0,5	Sensible
	CHN-11	> 200	Résistant
	ALPHA 10	> 200	Résistant
Sulfaprime S	YC-180 Yo-Flex®	> 350	Résistant
	Lyofast Y 456 B	250 < CMI _{50%} * < 300	Résistant
	CHN-11	> 350	Résistant
	ALPHA 10	> 350	Résistant
Ampicilline	YC-180 Yo-Flex®	> 0,5	Sensible
	Lyofast Y 456 B	0,5	Sensible
	CHN-11	> 10	Résistant
	ALPHA 10	> 10	Résistant

* CMI_{50%} : valeurs qui inhibent 50% des souches appartenant à la même espèce

II.1.3.3. Comparaison des résultats obtenus avec la littérature scientifique

(a) Pen&Strep

Les études de **Sozzi et Smiley (1980)** ont montré une résistance de 14 souches de *St. thermophilus* sur 15 en présence de 2 µg de l'antibiotique Streptomycine, et uniquement deux souches sur 29 souches testées de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. La valeur de CMI_{50%} trouvée par **d'Aimmo et al. (2007)** en présence de la Streptomycine seule dans le milieu était de 32 µl/ml. Nos résultats pour les ferments du yaourt ont montré une sensibilité des ferments en présence de la

Pen&Strep (association de pénicilline et de streptomycine). La pénicilline a accentué l'effet inhibiteur de la streptomycine, ce qui a donné des CMI plus faibles de l'ordre de 5 µl/ml. Les ferments du fromage étaient plus résistants à la Pen&Strep avec des CMI supérieures à 200 µl/ml.

(b) Sulfaprime S

Selon une étude menée par **Sozzi et Smiley (1980)**, 100% des souches de *St. thermophilus* testées (total de 15 souches) ont été jugées résistantes en présence de 25 µl/ml de l'antibiotique Triméthoprime. Les mêmes résultats ont été trouvés avec 300 µg de Sulfadiazine. De même, 29 souches de *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ont pu résister à 300 unités de Triméthoprime et à 300 µg de Sulfadiazine. Rappelons que la Sulfaprime S est une association de la Triméthoprime et de la Sulfadiazine. Nous avons constaté que toutes les souches de nos ferments sont résistantes à la Sulfaprime S avec une CMI supérieure à 250 µl/ml pour le ferment du yaourt Lyofast Y 456 B et des CMI supérieures à 350 µl/ml pour tous les autres ferments testés.

(c) Ampicilline

Nos résultats pour le ferment du yaourt Lyofast Y 456 B sont compatibles avec ceux obtenus par **d'Aimmo (d'Aimmo et al., 2007)**. Ce ferment est sensible à l'Ampicilline avec une CMI_{90%} de 0,5 µl/ml. Quant au ferment YC-180 Yo-Flex®, il survit mieux en présence de ce même antibiotique. Les valeurs des CMI peuvent varier légèrement entre les souches lactiques mais elles restent dans le même rang. Selon **Hummel et al., (2006)**, la CMI pour *St. thermophilus* et *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* était < 1 µl/ml et < 1,5 µl/ml respectivement en présence de l'Ampicilline.

Pour ce qui est des ferments du fromage, les valeurs obtenues pour les CMI de l'Ampicilline vis-à-vis des ferments CHN-11 et ALPHA 10 sont au-delà de 10 µl/ml. L'étude d'**Hummel et al. (2006)** a donné des valeurs de CMI inférieures à 1,5 µl/ml pour les souches *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *diacetylactis* qui font partie de la composition des ferments CHN-11 et ALPHA 10 (voir Tableau 26). La valeur trouvée par notre étude est bien supérieure ce qui laisse à penser à deux suppositions :

- Soit les souches *L. lactis* ssp. *lactis* et *L. lactis* ssp. *diacetylactis* des ferments CHN-11 et ALPHA 10 sont plus résistantes et requièrent des concentrations d'Ampicilline plus importantes pour les inhiber;
- Soit cette résistance est due aux autres souches contenues dans les mélanges qui constituent ces ferments.

II.1.4. Étude du contexte actuel de l'industrie laitière en Algérie

L'enquête Delphi est une méthode itérative pour l'analyse de problématiques et de consensus, qui a prouvé son intérêt au plan international pour résoudre des questions complexes, impliquant plusieurs acteurs (**Hanafin, 2004**). La valeur d'une enquête Delphi dépend du choix judicieux des experts et des questions initiales. Une préparation méticuleuse, ainsi qu'une description détaillée de la méthodologie contribueront à assurer la fiabilité et la validité des résultats (**Grundy et Ghazi, 2009; Hanafin, 2004**).

Les résultats recueillis de l'enquête Delphi ont mis en exergue le gouffre existant entre l'industrie laitière nationale et la recherche scientifique. Nous avons observé que les deux catégories d'experts (industriels et chercheurs) adoptent deux logiques différentes de raisonnement dans leurs réponses aux questions abordées dans les questionnaires. Les industriels sont motivés par une perspective pragmatique et économique (coût, praticité, fiabilité technologique, disponibilité des ferments...*etc.*), tandis que les chercheurs se focalisent sur les implications scientifiques, bioéthiques et socio-économiques de l'importation des ferments au détriment de l'exploitation raisonnée de la flore microbienne locale.

Bien qu'il y ait eu des essais de conventions entre les établissements de recherche et le secteur public dans le but de créer une dynamique de collaboration dans ce sens, ces expériences n'ont pas abouti. La raison principale qui fut avancée par les répondants est l'absence d'un cadre réglementaire adéquat pour pérenniser ce type de collaboration. En outre, l'absence d'une amélioration des circuits de la filière représente un frein considérable qui fait que ce secteur ne prendra aucune ampleur à l'avenir tant que le problème de fluctuations dans l'approvisionnement en matières premières n'est pas résolu. En effet, les résultats de notre enquête révèlent qu'une pénurie d'une matière première toujours importée (en particulier le lait en poudre), constitue un véritable risque par rapport à la rentabilité de la filière. Dans ce domaine, l'Algérie est loin derrière la Tunisie par exemple, qui jouit d'une quasi autonomie alors que l'Algérie souffre d'une forte dépendance des importations (80% des inputs de l'industrie laitière sont importés, selon les statistiques de 2007) (voir Tableau 33).

Tableau 33 : Benchmarking du marché algérien du lait et dérivés par rapport à la Tunisie (Kaci et Sassi, 2007).

Indicateurs	Algérie	Tunisie
<i>Source des approvisionnements en matières premières</i>	Forte dépendance des importations : Plus de 80% des inputs de l'industrie	Quasi autonomie
<i>Valeur des importations</i> <i>Taux de croissance</i>	Près de 600 millions de \$US Stable	Faible
<i>Structure de l'offre des produits</i>	- Lait pasteurisé 41% - Lait frais 14% - Lait fermenté 10% - Produits laitiers 20% - Lait en poudre 15%	- Lait de boisson 75% - Yaourt et autres produits frais 13% - Fromages 8% - Poudre 4%
<i>Transformation industrielle</i>	Développée, comparable à certains pays européens (Pologne, Portugal).	Idem

Le Tableau 34 résume les points de convergence et de divergence qui se sont cristallisés suite à l'analyse des résultats recueillis par l'enquête Delphi.

Tableau 34 : Convergences et divergences d'opinions des experts enquêtés sur le contexte actuel de l'industrie laitière nationale

	Chercheurs	Industriels
<i>Points de convergence</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne qualité des ferments lactiques importés. - Les fluctuations dans la production et la mauvaise qualité hygiénique de la matière première constituée principalement par le lait de vache. - Vide juridique en matière de ferments lactiques. - Manque d'associations et réseaux professionnels favorisant le partage des informations et des connaissances dans le domaine de la transformation laitière. 	
<i>Points de divergence</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Manque de confiance et de dynamique de collaboration durable entre le secteur industriel et la recherche scientifique. - Nécessité de protection et de bonne exploitation de la biodiversité microbienne autochtone. - Motivation pour la production locale des ferments lactiques. 	<ul style="list-style-type: none"> - Perceptions négatives sur le savoir-faire technique local, en particulier la maîtrise des procédés technologiques de fermentation.

Pour ce qui est de l'intérêt de fabriquer des ferments lactiques locaux, les deux catégories d'experts se sont prononcés pour. L'intérêt d'une telle démarche vers l'autonomie n'est plus à démontrer, aussi bien pour des raisons d'ordre économique que stratégique. Néanmoins, afin de concurrencer les ferments importés de bonne qualité technologique, il est indispensable de mettre en œuvre une dynamique durable de collaboration entre l'industrie laitière et le secteur de la recherche

scientifique. L'apport immédiat des techniques d'analyse biotechnologiques serait de mieux caractériser les ferments importés afin de concevoir des alternatives économiquement viables à partir du patrimoine génétique local. « *Il est très claire* » dit un expert : « *...que les ferments importés n'ont jamais été sujet à un contrôle (composition, souches, pureté, viabilité, rapport, phages,...) et de ce fait le risque d'utilisation de souches manipulées génétiquement est réel. Sur le plan économique, cette importation pèse lourd sur le plan financier ainsi que sur la marge bénéficiaire du fabricant des produits laitiers fermentés* ». En outre, il est crucial d'investir dans les compétences techniques en matière de technologie de la fermentation. Faute de quoi, l'algérien continuera à consommer un produit local de technologie et ingrédients importés.

II.2. Limitations de l'étude

Notre étude comporte des points forts et nouveaux qui donnent l'originalité au présent travail :

- L'étude Delphi nous a permis de sonder et contraster les avis des industriels et des chercheurs concernant les aspects importants relatifs à l'industrie laitière locale. Ceci nous a permis de cerner les atouts et défis liés à ce secteur économique stratégique et de définir les maillons fragiles et les points critiques à corriger afin de promouvoir la filière;
- L'étude des ferments lactiques importés qui, d'après notre recherche bibliographique, n'ont jusqu'à présent pas bénéficié d'études poussées afin d'effectuer une comparaison avec ceux isolés localement;
- La réalisation de tests préliminaires simples afin d'évaluer la susceptibilité des ferments importés aux antibiotiques couramment utilisés dans la production animale (notamment les vaches laitières).

Néanmoins, notre travail présente également plusieurs limitations dont nous citons :

II.2.1. Contrôle de la qualité microbiologique des ferments

- Une meilleure identification des bactéries lactiques isolées, notamment à partir des mélanges non caractérisés de ferments, aurait été possible par le biais d'une analyse PCR suivie d'une séparation par électrophorèse sur gel. Cependant, il ne nous a pas été pratique de réaliser cette expérience en raison de l'indisponibilité des amorces nécessaires, bien que nous les ayons identifiées.
- Nous n'avons pas pris en compte le germe *Listeria* dans la recherche des germes pathogènes en raison de l'indisponibilité des milieux de culture nécessaires pour rechercher ce germe qui constitue un indicateur important de la qualité du lait et produits dérivés.

II.2.2. Effet des antibiotiques

- Notre choix des antibiotiques testés était limité par la nécessité d'utiliser des antibiotiques qui soient hydrosolubles et ce afin de pouvoir préparer les dilutions directement dans le lait UHT écrémé en raison de l'indisponibilité du matériel nécessaire pour la préparation et la stérilisation des solutions des solvants et diluants adaptés aux antibiotiques insolubles dans l'eau. Il aurait été intéressant d'analyser l'effet d'autres antibiotiques ayant un large spectre d'action comme la Tétracycline et le Chloramphénicol par exemple, en raison de la résistance avérée des souches des ferments lactiques du yaourt à ces antibiotiques (CMI allant jusqu'à 16 µl/ml) (**d'Aimmo et al., 2007; Hummel et al., 2006**).
- Les résultats de la susceptibilité des ferments aux antibiotiques testés ne peuvent être qu'une approximation puisque l'analyse a été réalisée sur les ferments tels qu'ils sont utilisés en industrie et non sur les souches purifiées et identifiées.
- L'analyse de la cinétique de croissance initiale ainsi que l'augmentation de la durée de l'incubation jusqu'à 16 à 20 heures nous aurait permis de mieux explorer l'effet des antibiotiques sur la cinétique de fermentation. Cependant, il ne nous a pas été pratique d'augmenter les intervalles de temps en raison de l'insuffisance des consommables nécessaires pour la manipulation de grands nombres d'échantillons.
- Il aurait été plus précis d'utiliser la méthode des microplaques pour définir avec exactitude les CMI des différents antibiotiques vis-à-vis les ferments étudiés. Cette méthode aurait permis de tester un plus grand nombre d'antibiotiques et une gamme plus large de concentrations vu le mini volume des puits de la microplaque. Cependant, ceci aurait nécessité l'isolement et la purification des souches contenues dans chaque ferment, chose qui n'était pas pratique dans notre cas en raison de l'indisponibilité du matériel nécessaire pour ce genre d'étude.
- Etant donné que l'évaluation de l'effet des antibiotiques sur les ferments lactiques a été réalisée dans le lait UHT écrémé, l'effet des autres composants éventuellement ajoutés au lait pour la préparation du yaourt (*ex.* ajout du sucre ou d'additifs alimentaires) et du fromage (*ex.* ajout du sel) n'a pas été pris en compte. Il serait intéressant de faire une étude sur l'effet simultané des antibiotiques et d'additifs alimentaires sur la performance des ferments lactiques dans les produits laitiers fermentés. Cette combinaison pourrait avoir un effet plus ou moins important, puisque certains additifs pourraient avoir un effet inhibiteur et/ ou protecteur par rapport à la croissance des ferments lactiques.

II.2.3. L'enquête Delphi

- Le nombre d'experts constituant le panel consulté dans notre étude Delphi pourrait sembler limité. Cependant, Gordon (1994) note que la plupart des panels d'experts consultés dans les études de type Delphi varie de 15 à 35 répondants, mais il existe également des études avec des groupes de sept (Chu et Hwang, 2008) à 115 experts (Grundy et Ghazi, 2009).
- Un deuxième tour de l'enquête Delphi aurait permis de mieux dégager un consensus global pour les deux catégories d'experts interrogés (chercheurs et industriels). Toutefois, il ne nous a pas été pratique de réaliser un second tour de l'enquête Delphi en raison de l'indisponibilité de la majorité des experts sollicités dans le premier tour due à leurs engagements multiples.

Conclusions & Perspectives

I) CONCLUSIONS

Notre travail nous a permis de réaliser des tests d'identification et de contrôle de qualité sur des ferments lactiques importés utilisés dans l'industrie laitière algérienne ainsi que des tests préliminaires pour évaluer la susceptibilité de ces ferments à un panel de trois antibiotiques parmi les plus intensivement prescrits dans la production animale. En outre, nous avons effectué une enquête de type Delphi auprès d'un panel d'experts comprenant des opérateurs industriels et des chercheurs dans le domaine des bactéries lactiques et ce afin d'explorer les potentialités de développement de ferments lactiques autochtones. Outre les considérations économiques, l'importation des matières premières alimentaires posent plusieurs problèmes. En effet, les aliments sont des vecteurs de transmission de plusieurs infections, notamment d'origine microbienne. En outre, le transfert horizontal de gènes de résistance aux antibiotiques vers la flore intestinale du consommateur, par le biais des ferments lactiques importés incorporés dans les produits laitiers fermentés, pose un danger réel pour la santé publique. Une meilleure caractérisation des ferments lactiques utilisés est donc devenue un enjeu vital. En effet, nos résultats démontrent l'existence de degrés variables de susceptibilité, voire même résistance, aux antibiotiques Pen&Strep, Sulfaprime S et Ampicilline. Cependant, les techniques d'analyse classiques présentent plusieurs limitations par rapport à l'étude approfondie des mécanismes de résistance et les gènes qui en sont responsables afin de développer des moyens efficaces de détection et maîtrise du risque posé par ces microorganismes. Les outils de la biotechnologie moderne, en particulier les techniques d'analyse moléculaire, offrent plusieurs promesses dans cette perspective.

L'Algérie est en mesure de produire, à moyen terme, ses propres bactéries lactiques utilisées dans les produits laitiers, en particulier les espèces couramment utilisées. Cependant, afin de concurrencer les ferments importés, qui sont perçus favorablement par les opérateurs industriels en raison de leur fiabilité et facilité d'emploi, il est indispensable de mettre en œuvre une dynamique durable de collaboration entre l'industrie laitière et la recherche scientifique. De surcroît, il est nécessaire d'investir dans le développement de savoir-faire technique notamment dans le domaine des fermentations industrielles. L'apport immédiat des techniques d'analyse biotechnologiques serait de mieux caractériser les ferments importés afin de concevoir des alternatives viables, des points de vue commercial et technologique, à partir du patrimoine génétique local.

II) PERSPECTIVES

Notre étude mérite d'être complétée par la réalisation des études suivantes:

- Suivi des phases initiales de la fermentation afin d'examiner l'effet des antibiotiques sur la cinétique de croissance cellulaire, notamment pendant la phase exponentielle;
- Isolement et caractérisation moléculaire de souches autochtones à partir de différentes sources animales (lait ou produits fermentés naturels) ou végétales (olives et autres légumes fermentés);
- Comparaison des potentialités technologiques et propriétés fermentaires des souches autochtones avec les résultats obtenus pour les ferments importés;
- Production de mélanges de ferments lyophilisés prêts à l'emploi (DVS) pour certains types de fromages ou produits fermentés traditionnels;
- Réalisation d'un deuxième tour de l'enquête Delphi en s'adressant aux experts internationaux pour bénéficier de leur expérience dans ce domaine ;
- Validation de la méthode de contrôle de la qualité des ferments importés par PCR et le criblage des souches autochtones, en particulier:
 - o Séquençage des fragments amplifiés par PCR (gènes codant des propriétés technologiques intéressantes) pour une meilleure identification des souches autochtones isolées afin de construire une souche nationale et mise en marche d'une éventuelle production de ferments lactiques;
 - o Détection de gènes responsables de la résistance aux antibiotiques dans les ferments lactiques importés afin de mieux les caractériser.

En effet, l'identification des micro-organismes par les procédures phénotypiques conventionnelles basées sur les tests microbiologiques et biochimiques présente des limites en termes de reproductibilité et de précision et est très consommatrice en temps et en réactifs, une meilleure caractérisation des bactéries lactiques est possible en faisant appel aux méthodes de biologie moléculaire. La PCR permet quant à elle de mieux caractériser les ferments lactiques et par conséquent de mieux comprendre les procédés de fermentations lactiques industrielles, ce qui va se répercuter sur la qualité des produits laitiers locaux ainsi que sur le développement de l'économie du pays par production de produits laitiers concurrentiels.

Références bibliographiques

A

1. Abidi K., (2004). Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson, Thèse : Médecine vétérinaire, École nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie, 123 p.
2. AFSCA (2012). Contribution de l'alimentation à la transmission de l'antibiorésistance à l'homme (dossier SCI Com 2007/08: auto-saisine). Comité scientifique de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire, Avis 18-2012, 19 p.
3. Adams M. R., (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*, 68:171–178.
4. Allouche F. N., Hellal A. et Laraba A., (2010). Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Nature et Technologie*, 3 :13- 20.
5. Amellal R. (1995). La filière lait en Algérie : entre l'objectif de la sécurité alimentaire et la réalité de la dépendance. *CIHEAM - Options Méditerranéennes, Série B*, 14 :230-238.

B

6. Badis A., Laouabdia-Sellami N., Guetarni D., Kihal M. et Ouzrout R., (2005). Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir de lait cru de chèvre de deux populations caprines locales "arabia et kabyle". *Sciences & Technologie C*, 23 :30-37.
7. Béal C. et Sodini I. (2012). Fabrication des yaourts et des laits fermentés, Techniques de l'Ingénieur f6315, Paris-France, 16 p.
8. Bekhouche F. (2006). Bactéries lactiques du lait cru de vache et microorganismes pectinolytiques des olives noires et vertes : 1. Isolement et identification biochimique 2. Evaluation et optimisation de la production d'enzyme polygalacturonase, thèse de doctorat d'état en microbiologie et enzymologie, Option : génie alimentaire, Université de Mentouri Constantine, 119 p.
9. Bekhouche F. et Boulahrouf A., (2005). Etudes quantitative et qualitative des bactéries lactiques de lait cru produits par des vaches locales appartenant à six stations d'élevage de Constantine. *Sciences & Technologie C* 23 :38-45.
10. Boutonnier J-L., (2012). Fabrication du fromage fondu, Techniques de l'Ingénieur, f6310, Paris-France, 14 p.
11. Benkerroum N., Tamime A. Y., (2004). Technology transfer of some Moroccan traditional dairy products (Iben, jben and smen) to small industrial scale. *Food. Microbiol.* 65 :1-15.
12. Branger A. (2012), Fabrication de produits alimentaires par fermentation : l'ingénierie, f3501, Paris-France, p. 17.
13. Briggiler M. M., Reinheimer J. A. et Quiberoni A., (2010). Phage adsorption to *Lactobacillus plantarum*: Influence of physiological and environmental factors, *International Journal of Food Microbiology*, 138:270–275.
14. Broutin. C et al (2005). Maîtrise de la qualité dans la transformation laitière, Guide de bonnes pratiques d'hygiène, Groupe de recherche et d'échanges technologiques, 94 p.
15. Brusetti L., Malkhazova I., Mora D., Borin S., Merabishvili M., Zaccaria A., Colnago D., Chanishvili N. et Daffonchio D., (2008). Fluorescent- Box-PCR, an improved tool for resolving bacterial genetic diversity and biogeography studies. *BMC Microbiol.*, 8:220-232.

C

16. Carattoli, A., (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 : 117-123.

17. Chamba J.- F., et Irlinger F., (2004). Secondary and adjunct cultures. In *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 General Aspects, P. F. Fox, P. McSweeney, T. M. Cogan, and T. P. Guinee, p. 191-206. London, UK : Elsevier Academic Press Inc.
18. Châtaigner B. et Stevens A., (2005). Investigation sur la présence de résidus d'antibiotiques dans les viandes commercialisées à Dakar, Institut Pasteur de Dakar, 9 p.
19. Chougrani F., Cheriguene A. et Bensoltane A., (2008). Use of lactic strains isolated from Algerian ewe's milk in the manufacture of a natural yogurt. *Afr. J. Biotech.*, 7(8) :1181-1186.
20. Candioti M., Hynes E., Quiberoni A., Palma S., Sabbag N. et Zalazar C., (2002). Reggianito Argentina cheese: Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on cheese making and ripening processes. *Int. Dairy J.* 12:923 – 931.
21. Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V. et Reinheimer J., (2010). Advances and Trends in Starter Cultures for Dairy Fermentations, In Mozzi F. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Wiley-Blackwell Publishing, USA, 393 p.
22. Chamba J. F., (2008). Applications des bactéries lactiques lors des fabrications fromagères. In : Corrieu, G. and Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques - De la génétique aux ferments*. Lavoisier, Paris, p. 787-815.
23. Champagne C. P., Gagnon D., St-Gelais D. et Vuilleumard J. C., (2009). Interactions between *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* strains in Cheddar cheese processing conditions, *International Dairy Journal* 19:669–674.
24. Chen G. Q., (2010). *Plastics from bacteria 'Natural functions and applications'*, Springer, Microbiology Monographs, Volume 14, Münster, Germany, 450 p.
25. Corrieu G. et Luquet F-M., (2005). *Bactéries lactiques et probiotiques*, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 307 p.
26. Corrieu G. et Luquet F-M., (2008). *Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments*, édition Tec. et Doc. Lavoisier, Paris France, 849 p.

D

27. D'Aimmo M.R., Modesto M. et Bivati B., (2007). Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium ssp.* isolated from dairy and pharmaceutical products. *Int. J Food Microbiol* 115 :35-42.
28. Directive européenne : CVMP (2000). The european agency for the evaluation of medicinal products, *Evaluation of medicines for veterinary use*, Note for guidance for the assesement of the effect of antimicrobial substances on dairy starter cultures, p. 7.
29. De Angelis M., de Candia S., Calasso M., Faccia M., Guinee T., Simonetti M. et Gobbetti M., (2008). Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high - moisture traditional Mozzarella cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125:123-132.
30. De Candia S., De Angelis M., Dunlea E., Minervini F., McSweeney P., Faccia M. et Gobbetti M., (2007). Molecular identification and typing of natural whey starters cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *Int. J. Food Microbiol.*, 119:182-191.
31. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K-H. et Whitman W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, Volume 3: the *Firmicutes*, Springer USA, 1422 p.

32. De Vuyst L. et Tsakalidou E., (2008). *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations. *Int. Dairy J.* 18:476-485.
33. Delorme C., (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126:274–277.

E

34. European Food Safety Authority (2008). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA Journal*, 765 : 1-87.
35. Edward V. A., Huch M., Dortu C., Thonart P., Egounlety M., Van Zyl P. J., Singh S., Holzapfel W. H. et Franz C. M. A. P., (2010). Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. *Food Control*, 22(3-4): 389-395.
36. Emond E. et Moineau S. (2007). Bacteriophages in food fermentations. *In: Bacteriophages. Genetics and Molecular Biology*, ed. S. McGrath and D. van Sinderen, Norfolk, UK: Cyster Academic Press. p. 93-124.

F

37. Fabre J. M, Moretain J. P. et Berthelot X., (2002). Évolution de la méthode interprofessionnelle de recherche des résidus d'antibiotiques dans le lait. *Bulletin des GVT*, 15 :26-28.
38. Fabre J-M., Petit C. et Bosquet G., (2006). Extrait du livre : Comprendre et prévenir les risques de résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale.
http://www.dsm.com/le/static/delvotest/downloads/GuideDelvotest10Points_Fr.pdf
Date de consultation : 03/07/2012
39. Federicci-Mathieu C., (2000). Résidus dans le lait et sécurité alimentaire : quels risques ? Quels moyens de maîtrise ? *Bulletin des GVT*, 7 :21-22.
40. Foucaud-Scheunemann C. et Helinck S., (2012). Les micro-organismes au cœur des biotechnologies, bio550, Paris-France, 15 p.

G

41. Garneau J. E. et Moineau S., (2011). Bacteriophages of lactic acid bacteria and their impact on milk fermentations, *Microbial Cell Factories*, From 10th Symposium on Lactic Acid Bacterium Egmond aan Zee, the Netherlands. 28 August - 1 September 2011, 10 p.
42. Ghazi F. Z., Aggad H., Guessas B., Henni D. et Kihal M., (2006). Phenotypic identification and whole cell protein analysis by SDS-Page for dominants lactic acid bacteria isolated from Algerian raw milk. *Journal Algérien des zones arides*, 5 :25-35.
43. Gianni de Carvalho K. L., Kruger M. F., Behrens J., Destro M. T., Landgraf M. et Gombossy de Melo Franco B. D., (2009). Evaluation of culture media for enumeration of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium animalis* in the presence of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*, *LWT - Food Science and Technology*, 42 :491–495.
44. Grundy M. et Ghazi F., (2009). Research priorities in haemato-oncology nursing: results of a literature review and a Delphi study, *Eur J Oncol Nurs*, 13(4) :235-249.

45. Gibson G. R. et Williams C. M., (2000). Functional foods Concept to product, CRC Press LLC, USA, 374 p.
46. Giraffa G., Chanishvili N. et Widyastuti Y., (2010). Importance of *lactobacilli* in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*, 161:480-487.
47. Guiraud J. P., (2003). Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Dunod, série Agro- alimentaire, Paris, 652 p.
48. Guillemot M. D., Chauvin C., Colin P., Danan C., et Sanders P., (2006). Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine Document AFSSA, p. 49-55.
49. Gysi M., (2006). Antibiotiques utilisés en production laitière en 2003 et 2004. *Suisse Agric.*, 38(4) :215-219.

H

50. Hadadji M., Benama R., Saidi N., Henni D. E. et Kihal M., (2005). Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants feces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 4 (5) :422-430.
51. Hansen E-B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78:119–131.
52. Hariri A., Ouis N., Sahnouni F. et Djilali B., (2009). Mise en œuvre de la fermentation de certains ferments lactiques dans des milieux a base des extraits de caroube, *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn.*, Congrès international BIOMED 1 Marrakech du 2-5 Novembre, p. 37-55.
http://www.remise.ma/images/Congres2009/hariri_2010.pdf
Date de consultation : 26/08/2012
53. Hejnowicz M. S., Gołębiewski M. et Bardowski J., (2009). Analysis of the complete genome sequence of the lactococcal bacteriophage bIBB29. *International Journal of Food Microbiology*, 131:52–61.
54. Hofman M. et Thonart P., (2002). Engineering and Manufacturing for biotechnology, Volume 4, Kluwer Academic Publishers, 490 p.
55. Hols P., Hancy F., Fontaine L., Grossiord B., Prozzi D. et Leblond-Bourget N., (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiology Reviews*, 29:435–463.
56. Hui Y. H., (1992). Dairy Science and Technology Handbook, Wiley-VCH Verlag GmbH Edition, 1150 p.
57. Humme A. S., Hertel C., Holzappel, W.H. et Franz C. M., (2006). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 :730-739.
58. Hylckama Vliega J. E. T. et Hugenholtz van J., (2007). Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits, *International Dairy Journal*, 17:290–1297.

I

59. IDF 223 (2010). Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria (LAB), ISO 10932, 31 P.
60. IDF (2005). The world market for cheese 1995–2004, Bulletin n° 402, Brussels, Belgium: International Dairy Federation (IDF).
61. Idoui T., Boudjerda J., Leghouchi E et Karam N. E., (2009). Lactic acid bacteria from “Sheep’s Dhan”, a traditional butter from sheep’s milk: Isolation, identification and major technological traits, *Grasasy Aceites*, 60(2) :177-183.

62. Iyer R., Tomar T. R., Maheswari T. U. et Singh R., (2009). *Streptococcus thermophilus* strains: Multifunctional lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 20:133–141.

J

63. Jean-Noel J. et Guy L., (2006). Microbiologie technique, 4^{ème} édition : dictionnaire des techniques, CRDP d'Aquitaine. 368 p.
64. JORA n° 32 du 23 mai 2004. Arrêté du 27 mars 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des organismes microbiens pour le lait fermenté.
65. JORA n° 42 du 15 juin 2005 Arrêté 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de recherche des *salmonella* dans le lait et les produits laitiers.
66. JORA n° 43 du 4 juillet 2004. Arrêté du 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des coliformes dans les laits fermentés.
67. JORA n° 70 du 7 novembre 2004. Arrêté 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de préparation des échantillons pour l'essai et les dilutions en vue de l'examen microbiologique.

K

68. Kelly B. G., Vespermann A. et Bolton D. J., (2009). Gene transfer events and their occurrence in selected environments. *Food and Chemical Toxicology*, 47 : 978–983.
69. Kaci M. et Sassi Y., (2007). Industrie laitière et des corps gras, Recueil des fiches sous sectorielles. EDPme. 44 P.
70. Keohane J., Ryan K. et Shanahan F., (2009). *Lactobacillus* in the gastrointestinal tract. In: Ljungh, A., Wadstrom, T. (Eds.), *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press, Norfolk, p.169-181.
71. Kurtmann L., Carlsen Ch. U., Risbo J. et Skibsted L. H., (2009). Storage stability of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5) in relation to water activity and presence of oxygen and ascorbate, *Cryobiology*, 58:175–180.

L

72. Lavigne J. P., (2010). Bactériologie : Effet des antibiotiques, mécanismes de résistance, Cours en ligne Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, 12 p.
73. Lebres A. D. et Hamza A., (2002). Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments « Microbiologie des laits et produits laitiers », Institut Pasteur d'Algérie.
74. Lee K-C., Liu C-F. et Lin T-H., Pan T-M., (2010). Safety and risk assessment of the genetically modified *Lactococci* on rats intestinal bacterial flora, *International Journal of Food Microbiology*, 142 :164–169.
75. Leroy F. et De Vuyst L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science and Technology*, 15:67–78.
76. Leuschner R. G. K., Robinson T. P., Hugas M., Cocconcelli P-S., Richard-Forget F., Klein G., Licht T. R., Nguyen-The C., Querol A., Richardson M., Suarez J. E., Thrane U., Vlaski J. M. et von Wright A., (2010). Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology*, 21:425-435.

77. Limsowtin G. K. Y., Powell I. B. et Parente E., (1996). Types of starters. In Dairy Starter Cultures, ed. T.M. Cogan and J. - P. Accolas, New York, USA: VCH. p.101 – 129.

M

78. Macedo A. C., Travares T. G. et Malcata F. X., (2004). Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of serra da Estrella cheese. *Food Microbiology*, 21 : 233-240.
79. Maghuin-Rogister G., Janosi A., Helbo V., Van Peteghem C., Sanders E., Van Eeckhout E., Cornelis M. et Jouret M., (2001). Stratégie intégrée d'analyse qualitative et quantitative des résidus de substances antimicrobiennes dans les denrées alimentaires Services scientifiques du premier Ministre Affaires scientifiques, techniques et culturelles (SSTC) France. Rapport Final SSTC, p. 13-58.
80. Makarova K., Slesarev A., Wolf Y., Sorokin A., Mirkin B. et Koonin E., (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 429(103) :15611–15616.
81. Marino M., Maifreni M. et Rondinini G., (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 229:133–140.
82. Marth E. H. et Steele J. M., (2001). Applied dairy microbiology, 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc, New York, USA, 744 p.
83. Mathur, S. et Singh, R., (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 105 : 281-295.
84. Mattila-Sandholm T. et Saarela M., (2003). Functional dairy products, CRC Press, 395 p.
85. Mayrhofer S., Domig K. J., Amtmann E., Van Hoek A. H., Petersson A., Mair C., Mayer H. K. et Kneifel W., (2007). Antibiotic susceptibility of *Bifidobacterium thermophilum* and *Bifidobacterium pseudolongum* isolates from animal sources. *J Food Prot.*, 70(1) :119-24.
86. Mechai A. et Kirane D., (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk "Raïb". *African Journal of Biotechnology*, 7 (16) : 2908-2914.
87. Menéndez S., Centeno J., Godínez R. et Rodríguez-Otero J., (2000). Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa - Ulloa cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 59:37-46.
88. Metlef S. et Dilmi Bouras A., (2009). Effet antagoniste de *Lactococcus lactis*, souches extrêmophiles locales, sur des espèces de la flore intestinale résidente, *Nature et Technologie*, 1 :33-44.
89. Michaylova M., Minkova S., Kimura K., Sasaki T. et Isawa K., (2007). Isolation and characterization of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* from plants in Bulgaria. *FEMS Microbiology Letters*, 269:160–169.
90. Mozzi F., Raya R. R. et Vignolo G. M., (2010). Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications, Wiley-Blackwell Publishing, USA. 393 p.

N

91. Nollet L. M. L. et Toldrá F., (2010). Handbook of Dairy Foods Analysis, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 900 p.

O

92. Ouadghiri M., (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés «Lben» et «Jben» d'origine marocaine, thèse de doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-agdal Faculté des sciences Rabat, Maroc. 132 p.

P

93. Parente E. et Cogan T. M., (2004). Starter cultures: general aspects. In: Fox, P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M. et Guinee, T. P. (Eds.), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. I. Chapman and Hall, London, p.123-148.
94. Pfeiler E. A. et Klaenhammer T. R., (2007). The genomics of lactic acid bacteria, *Trends in Microbiology*, 15(12):546-553.
95. Pisano M., Fadda M., Deplano M., Corda A., Casula M. et Cosentino S., (2007). Characterization of Fiore Sardo cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *J. Dairy Res.*, 74:1-7.
96. Planchon S., Leroy S., Chambon C., Chafsey I., Hébraud M. et Talon R., (2009). Physiologie de la croissance en biofilm de *Staphylococcus xylosus* par une approche proteomique, 11èmes JSMTV - Clermont Fd., p.169-170.
97. Powell C., (2003). The Delphi technique: myths and realities, *Journal of Advanced Nursing*, 41(4) :376-382.

Q

98. Quiberoni A., Moineau S., Rousseau G. M., Reinheimer J. et Ackermann H-W., (2010). *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *International Dairy Journal*, 20:657-664.

R

99. Randazzo C., Vaughan E. et Caggia C., (2006). Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR – DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109:1–8.
100. Ravin V., Sasaki T., Räisänen L., Riipinen K-A., Alatossava T., (2006). Effective plasmid pX3 transduction in *Lactobacillus delbrueckii* by bacteriophage LL-H, Elsevier, p.184–193.
101. Ray B. et Bhljnia A. (2008). *Fundamental food microbiology*, fourth edition Taylor & Frands Group CRC Press, 492 p.
102. Remacle C. et Reusens B., (2004). *Functional foods, ageing and degenerative disease*, CRC Press LLC, 771 p.
103. Renault P. (2002). Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment, *Biochimie*, 84:1073–1087.
104. Robinson R. K., (2002). *Dairy Microbiology Handbook*, third Edition, John Wiley and Sons, Inc., New York USA, 764 p.
105. Rodríguez González A., García P. et Raya R. R., (2010). Chapter 6: Bacteriophages of Lactic Acid Bacteria, *In: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*, Wiley-Blackwell Publishing, USA. 393 p.
106. Roudj S., Belkheir K., Karam H. Z. et Karam N. E., (2009). Proteolysis and Autolysis Properties of two Lactobacilli Isolated from Camel Milk of South-Western Algeria, *European Journal of Scientific Research*, 34 (2):218-227.

S

107. Saithong P., Panthavee W., Boonyaratanakornkit M. et Sikkhamondhol Ch., (2010). Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented fish, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(5):553–557.
108. Salminen S., Wright A. et Ouwehand A., (2004). Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Edition, Marcel Dekker, Inc.USA, 628 p.
109. Sánchez A., Rodríguez R., Coton M., Coton E., Herrero M., García L. A. et Díaz M., (2010). Population dynamics of lactic acid bacteria during spontaneous malolactic fermentation in industrial cider, *Food Research International*, 43:2101–2107.
110. SCAN (2003). Report of the SCAN on the safety of the microorganism product Provita E for the use as feed additive. European Commission Publications.
111. Schwab C., Vogel R. et Gänzle M. G., (2007). Influence of oligosaccharides on the viability and membrane properties of *Lactobacillus reuteri* TMW1.106 during freeze-drying, *Cryobiology* 55:108–114.
112. Settanni L. et Moschetti G., (2010). Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits, *Food Microbiology*, 27:691-697.
113. Shetty K., Paliyath G., Pometto A. et Levin R. E., (2006). Food biotechnology, Second Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, 1982 p.
114. Silbergeld E. K., Graham J. P. et Price L. B., (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Public Health*, 29 :151-169.
115. Smith J. et Charter E., (2010). Functional Food Product Development, Blackwell Publishing Ltd, 512 p.
116. Sozzi T. et Smiley M. B., (1980). Antibiotic Resistances of Yogurt Starter Cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, *Applied and environmental microbiology*, 40(5) :862-865.
117. Stine O. C., Johnson J. A. et Keefer-Norris A., (2007). Widespread distribution of tetracycline resistance genes in a confined animal feeding facility. *Int J Antimicrob Agents*, 29 :348-352.
118. Sturino J. M. et Klaenhammer T. R., (2006). Engineered bacteriophage - defence systems in bioprocessing. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:395-404.
119. Solieri L. et Giudici P., (2009). Vinegars of the World Springer-Verlag Italia, 297 p.
120. Srinivasan V., Nam H.-M., Sawant A. A., Headrick S. I., Nguyen L. I. et Oliver S. P., (2008). Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microb. Ecol.* 55 :184–193.
121. Stoltz E. I. et Hankinson D. J., (1952). Antibiotics and Lactic Acid Starter Cultures, Department of Dairy Industry, University of Massachusetts, Amherst, p. 24-29.

T

122. Tabak S. et Bensoltane A., (2012). L'activité antagoniste des bactéries lactiques (*Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum* et *Lactobacillus bulgaricus*) vis à vis de la souche *Helicobacter pylori* responsable des maladies gastroduodénales, *Nature & Technologie* 6 :71-79.
123. Tamime A., (2005). Probiotic Dairy Products, Dairy Science and Technology Consultant Ayr, UK, Blackwell Publishing Ltd., 216 p.

124. Thirabunyanon M., Boonprasom P. et Niamsup P., (2009). Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells. *Biotechnol. Lett.*, 31:571–576.
125. Trivedi P. C., (2009). *Microbes' applications and effects*, Aavishkar Publishers, Distributors India, 265 p.

U

126. Uchida K., Urashima T., Chanishvilli N., Arai I. et Motoshima H., (2007). Major microbiota of lactic acid bacteria from Matsoni, a traditional fermented milk in Georgia. *Anim. Sci. J.* 78:85-91.

V

127. Von Mollendorff J. W., (2008). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria from fermented beverages and optimization of starter cultures. *Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science at the University of Stellenbosch, study-leader: Prof. L.M.T. Dicks. 130 p.*

W

128. Wildman R. E. C., (2007). *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods*, Second Edition, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 541 p.

Y

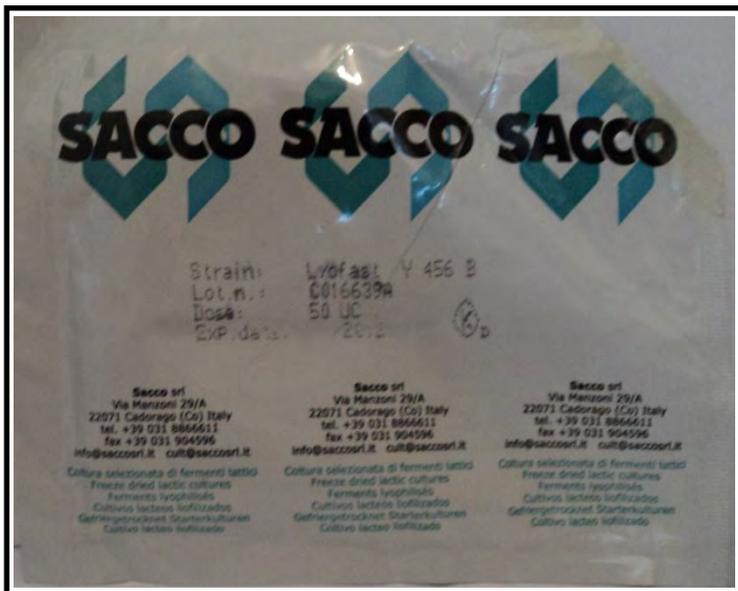
129. Yala D., Merad A. S., Mohamedi D. et Ouar Korich M. N., (2001). Classification et modes d'action des antibiotiques, *Médecine du Maghreb* 91 :13-19.
130. Yıldız F., (2010). *Development and manufacture of yougurt and other dairy products*, CRC Press Taylor & Francis Group, USA, 435 p.

Z

131. Zadi-Karam H. et Karam N-E., (2006). Elaboration de ferments lactiques mésophiles et fabrication de fromages à pâte fraîche, *Renc. Rech. Ruminants* 13:449-452.
132. Zhao G. et Zhang G., (2009). Influence of freeze-drying conditions on survival of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation, *International Journal of Food Microbiology* 135:64–67.

Annexes

Annexe 1 : Échantillons des ferments lactiques analysés



Ferment Lyofast Y 456 B

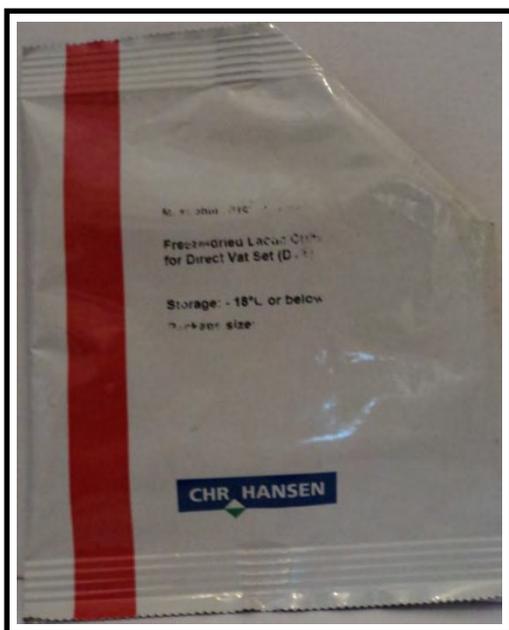


Ferment YC-180 Yo-Flex®

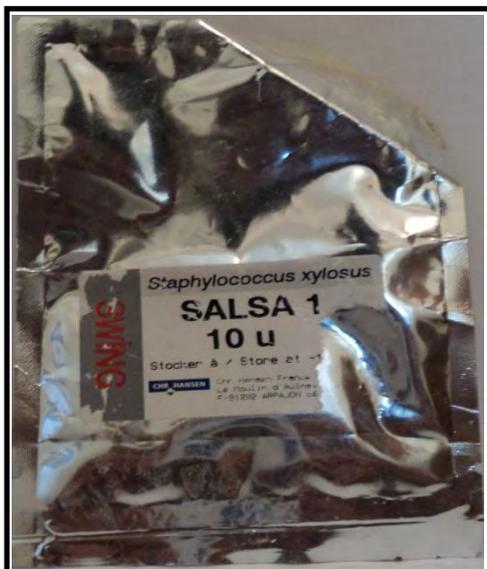




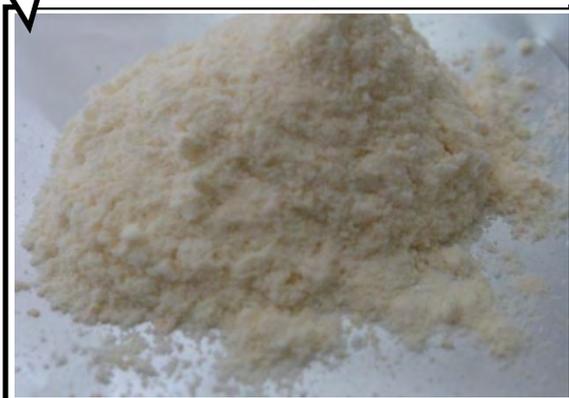
Ferment lactique ALPHA 10



Ferment lactique CHN-11



Ferment lactique SALSA 1



Fiche technique d'un ferment lactique lyophilisé SACCO [Lyofast Y 330 A]



Lyofast Y 330 A

Description

Lyofast Y 330 A consists of specifically selected strains of *Streptococcus thermophilus* producing EPS and low content of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* to ensure a uniform and controlled production of very mild set and stirred yoghurt with high viscosity.

Application

Sprinkle the culture powder directly into process milk under aseptic conditions ensuring that the culture is well dispersed by gentle stirring. The following may be used as inoculation guidelines:

Product	UC/100 l	Product	UC/100 l
Yoghurt, short set	2.0-3.0	Yoghurt, long set	0.5-1.0

Rotation

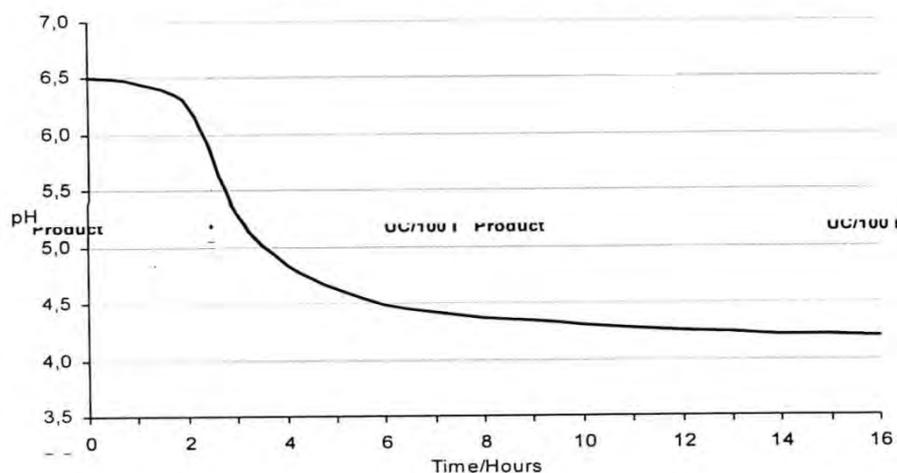
The recommended rotations are Y 332 A/Y 336 A.

Acidification information

Standardised laboratory acidification test is conducted in milk powder, reconstituted at 10%, at defined temperature.

Acidification profile: inoculation level corresponding to 1 UC per 100 litres milk.

Standard activity: expressed as temperature/time/pH relations: 43°C/6 hours/pH 4.5 ± 0.15.



Culture information

Data are obtained under standardised laboratory conditions, and consequently, should be considered as guidelines:

Optimal temperature for growth	43°C	Aroma formation for yoghurt	+
Acidification capability	pH 4.2/4.15	Texture formation	4±1 sec/g

Storage

Unopened pouches should be kept at or below -18°C.

Package data

The freeze-dried culture is packed in waterproof and airproof aluminium pouches. Lyofast Y 330 A is available in 10 and 50 UC.

Shelf life

12 months when stored at or below 4°C, 18 months when stored at or below -18°C. The shelf life includes up to 14 days of shipment at temperatures below 30°C.

Heavy metal specification

Pb (lead)	< 1 ppm
Hg (mercury)	< 0.03 ppm
Cd (cadmium)	< 0.1 ppm

CLERICI
SACCO

Lyofast Y 330 A

Microbiological specification	<i>Bacillus cereus</i>	<100 CFU/g	Method: Sacco M10 (1)
	Coagulase positive staphylococci*	<10 CFU/g	Method: Sacco M11(2)
	Enterobacteriaceae	<10 CFU/g	Method: Sacco M2 (3)
	<i>Escherichia coli</i>	<1 CFU/g	Method: Sacco M27 (4)
	<i>Listeria monocytogenes</i> *	Not detected in 25 g	Method: Sacco M13 (5)
	Moulds & yeasts	<10 CFU/g	Method: Sacco M3 (6)
	<i>Salmonella spp</i> *	Not detected in 25 g	Method: Sacco M12 (7)

* Analysed on regular basis. All analytical methods are available upon request.
 (1)ISO 7932. (2)ISO 6888-1-2; (3)ISO 215281-2; (4)ISO 11866-1-2/IDF 170-1-2; (5)ISO 11290-1-2; (6)ISO 6611/IDF 94; (7)ISO 6785/IDF 93;

GMO The microbial strains are not genetically modified (GMO) in accordance with the European Directive 90/220/EEC. The strains are isolated from natural sources. The raw materials used are also GMO free in accordance with Regulation (EC) No. 1829/2003 and Regulation (EC) 1830/2003. Statement available upon request.

Allergens The raw materials used are generally based on dairy ingredients. All materials are free of the following components and their derivatives: peanut, tree nut, sesame, egg, fish, shellfish, mollusc, crustacean, sulphite, wheat, celery, mustard, soy and lupine. Statement available upon request.

Safety information Material Safety Data Sheet available on www.saccosrl.it

Certificate Lot certificate available upon request.

ISO Sacco S.r.l. is UNIFEN ISO 9001:2000 certified since 1998. Sacco cultures are generally Kosher approved except for surface ripening cultures.

Kosher approval

Service Please contact your distributor for guidance and instructions for your choice of culture and processing. Information about additional package sizes and sales units is also available upon request.

Liability This information is based on our knowledge trustworthy and presented in good faith. No guarantee against patent infringement is implied or inferred.

Annexe 2 : Composition des principaux milieux de culture**Gélose MRS (pH = 6,2 ± 0,2) (CONDA Pronadisa) (De Man et al., 1960)**

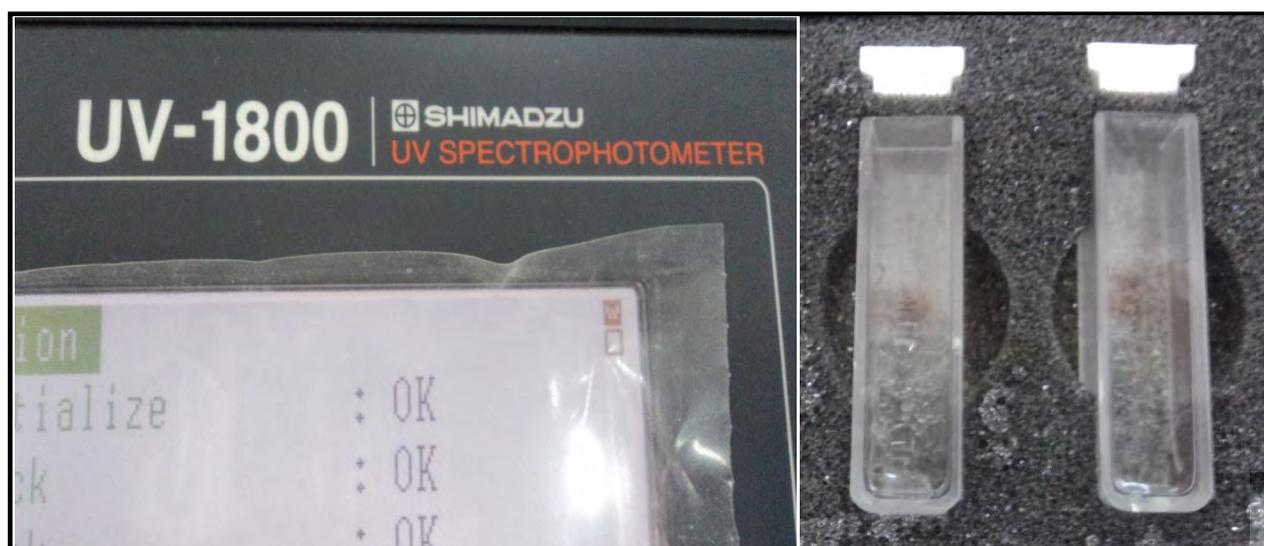
- Peptone 10,0 g
- Extrait de viande 8,0 g
- Extrait de levure 4,0 g
- Glucose 20,0 g
- Acétate de sodium trihydraté 5,0 g
- Citrate d'ammonium 2,0 g
- Tween 80 1,0 ml
- Hydrogénophosphate de potassium 2,0 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 g
- Sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g
- Agar 10,0 g

Gélose M17 (pH = 6,2 ± 0,2) (CONDA Pronadisa) (Terzaghi et Sandine, 1975)

- Tryptone 5,0 g
- Peptone de soja 5,0 g
- Infusion de viande 5,0 g
- Extrait de levure 2,5 g
- Glycérohydrogénophosphate de sodium 19,0 g
- Lactose 5,0 g
- Acide ascorbique 0,5 g
- Sulfate de magnésium 0,25 g
- Agar 11,0 g

Annexe 3 : Appareils et matériels de paillasse

- Etuve [MEMMERT] pour incubation des différentes cultures bactériennes ;
- pH mètre [JENWAY] pour ajustement et mesure du pH ;
- Bain marie [MEMMERT] ;
- Spectrophotomètre [SHIMADZU UV-1800] pour mesurer l'absorbance à 600nm ;
- Réfrigérateur [SAMSUNG] pour conservation des souches et des produits et réactifs à basse température ;
- Balance de précision [METTLER TOLEDO] pour les différentes pesées ;
- Agitateur-Vortex [SCHOTT SLR] pour homogénéisation des dilutions ;
- Microscope optique [WITZLAR] pour observation en immersion ;
- Agitateur magnétique pour homogénéisation des différents milieux préparés ;
- Autoclave pour stérilisation des milieux de culture et du matériel utilisé.



Spectrophotomètre SHIMADZU et cuves en quartz pour mesurer les absorbances 600 nm

Annexe 4 : Réactifs chimiques et autres produits

Réactifs de la coloration de Gram (Giraud, 2003)

- **Solution de violet de gentiane** : 1g de violet de gentiane ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 2g de phénol ajoutés à 100ml d'Eau distillée ;
- **Solution de lugol** : 1g d'iodure de potassium ; 1g d'iode ajoutés à 300 ml d'eau distillée ;
- **Solution de fuschine de ziehl** : (Guiraud et Galzy, 1980). 1 g de Fuschine ; 10ml d'alcool éthylique à 95% ; 5g de phénol ajoutés à 100ml d'eau distillée.

Diluants

- **Eau peptonée tamponnée** : Sa composition est riche en peptone (10,0 grammes par litre), le pH est ajusté à $7,2 \pm 0,2$ et le milieu doit être stérilisé avant son utilisation.
- **Eau physiologique** : Solution préparée par ajout de 9g de chlorure de sodium à 1000 ml d'eau distillée. C'est une solution isotonique, qui permet de préserver le volume cellulaire.

Autres réactifs

- Eau oxygénée : pour recherche de la catalase ;
- Glycérol (5%) pour conservation des souches ;
- NaCl pour tester la croissance sur milieux hostiles ;
- Lait UHT écrémé pour revivification des ferments ;
- Les sucres : Glucose, Galactose, Fructose, Saccharose, Lactose, Maltose, Melibiose, Mannitol.

Les antibiotiques testés



Pen&Strep : Association Pénicilline et Streptomycine

Ampicilline : Ampicilline tri-hydratée

Sulfaprim S : Association Sulfadiazine et Triméthoprime

Annexe 5 : Tableau NPP de MAC GRADY

NOMBRE LE PLUS PROBABLE (NPP) POUR TROIS SERIES PARALLELES							
Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)	Index Tubes positifs de			NPP (pour 10 g)
10 g	1,0 g	0,1 g		10 g	1,0 g	0,1 g	
0	0	0	0	2	2	3	4,0
0	0	1	0,3	2	3	0	3,0
0	1	0	0,3	2	3	1	3,5
0	1	1	0,6	2	3	2	4,0
0	2	0	0,6	3	0	0	2,5
1	0	0	0,4	3	0	1	4,0
1	0	1	0,7	3	0	2	6,5
1	0	2	1,1	3	1	0	4,5
1	1	0	0,7	3	1	1	7,5
1	1	1	1,1	3	1	2	11,5
1	2	0	1,1	3	1	3	16,0
1	2	1	1,5	3	2	0	9,5
1	3	0	1,6	3	2	1	15,0
2	0	0	0,9	3	2	2	20,0
2	0	1	1,4	3	2	3	30,0
2	0	2	2,0	3	3	0	25,0
2	1	0	1,5	3	3	1	45,0
2	1	1	2,0	3	3	2	110,0
2	1	2	3,0	3	3	3	140,0
2	2	0	2,0				
2	2	1	3,0				
2	2	2	3,5				

Annexe 6 : Questionnaires



**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique**

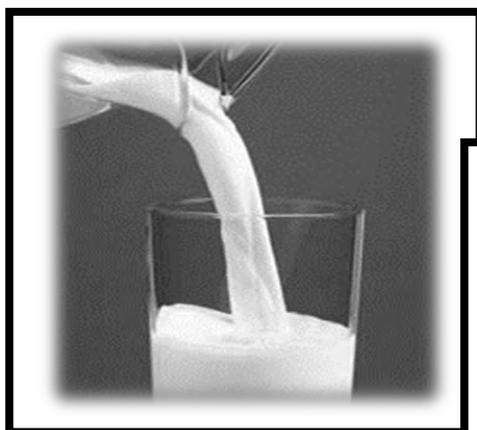
Université MENTOURI Constantine

INATAA

Département de biotechnologie

Questionnaire destiné aux unités de production laitière en Algérie

Utilisation de ferments lactiques au niveau de l'industrie laitière locale



Thèse de magister préparée par: M^{elle} LEKSIR Choubaïla

Encadré par: D^r BOUSHABA. R

2^{ème} Année post-graduation sciences alimentaires

Option : *Biotechnologies alimentaires.*

Intitulé de la thèse : *'Évaluation du potentiel de la biotechnologie dans la caractérisation et le contrôle de qualité de ferments lactiques utilisés en industrie laitière'.*

Veillez-répondre aux questions suivantes S.V.P

Année pédagogique 2010-2011.

Section I : À propos de l'unité de production

Q1- Depuis combien d'années vous êtes dans le domaine de l'industrie laitière en Algérie ?

R1-.....

Q2- De quelles compétences particulières votre entreprise a besoin pour réaliser votre stratégie de développement ?

R2-

Q3- Quel diplôme possède le responsable de production de votre unité ?

R3-.....

Q4- Disposez-vous d'un laboratoire dans votre unité de production ?

R4- Oui Non

Q5- Si oui quelles sont ses principales fonctions ?

R5-.....

Q6- Quel type d'analyses exigez-vous appliquer sur le lait collecté destiné à la transformation ?

R6-.....

Section II : Utilisation de ferments lactiques pour inoculation du lait

Q1- Les ferments lactiques que vous utilisez dans la production de produits laitiers :

- Vous les préparez vous-mêmes
- Vous les achetez directement prêts à l'emploi

Q2- Quelles difficultés rencontrez-vous pour l'obtention des ferments lactiques dont vous avez besoin ?

R2-

Q3- Les ferments lactiques que vous utilisez au niveau de votre unité de production sont-ils :

- Bio (naturels)
- OGM (génétiquement modifiées)
- Aucune idée

Q4- Obtenez-vous ces ferments par le biais de fournisseurs spécifiques pour ce type de produits ou bien ils sont facilement trouvés sur marché ?

R4-

Q5- Pouvez-vous indiquer le mode de conservation de ces ferments au sein votre unité ?

R5-

Q6- Dans quel état sont commercialisés ces ferments ?

- Congelés en boites
- Lyophilisés en sachets
- Autre (précisez).....

Q7- Selon vous quels sont les critères qui entrent dans la détermination du prix des ferments lactiques disponibles sur le marché ? En d'autres termes, quelles sont les particularités des ferments les plus chers ?

R7-.....

Q8- Avez-vous reçu des offres locales (Algérie) pour des méthodes de développement des inocula utilisés dans l'industrie laitière.

R8-.....

Q9- Si vous auriez l'occasion de travailler avec des ferments isolés et caractérisés en Algérie par des services compétents, quelle serait votre opinion/réponse ?

R9-.....

Section III : Industrie laitière enjeux et défis

Q1- Sachant l'importance de l'industrie laitière considérée comme une industrie importante pour la santé et l'économie, pouvez-vous me citer les principaux problèmes et limitations dont souffre cette dernière pour le cas de votre unité de production ?

R1-

Q2- Y'a-t-il des associations spécialisées dans la filière lait et produits laitiers en Algérie où vous pouvez discuter de vos problèmes et contraintes de terrain afin de trouver des solutions ou une éventuelle prise en charge.

R2-

Section IV : Nouveaux produits laitiers

Q1- Comment voyez-vous l'avenir de l'industrie de transformation laitière en Algérie ? Quels sont les aspects à améliorer/ développer ?

R1-

.....

.....

Q2- Le marché national est riche en produits laitiers locaux, mais le consommateur n'a pas une grande variété de produits (la plupart des produits se ressemblent mis à part l'emballage). Ce qui n'est pas le cas en Europe. Selon vous, à quoi est due cette situation ? Pensez-vous que le consommateur est satisfait des produits laitiers disponibles sur marché ?

R2-

.....

Q3- Souhaitez-vous faire une collaboration avec un laboratoire de recherche agro-alimentaire afin de développer de nouveaux produits bénéfiques pour la santé et ayant une bonne valeur marchande ?

R3- Oui

Non

- Si non pourquoi pas?

.....

.....

Q4- Pouvez-vous autoriser des ingénieurs de fin de cycle ou des étudiants de magister à effectuer une partie de leur étude expérimentale au sein de votre unité si vous disposiez des moyens nécessaires pour faire ?

R4- Oui

Non

- Si non pourquoi pas?

.....

.....

Merci pour votre collaboration



**Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique**
Université MENTOURI Constantine
INATAA

Questionnaire destiné aux chercheurs et experts dans le domaine des bactéries lactiques en Algérie

Présentation du questionnaire

- Ce questionnaire s'adresse aux chercheurs et experts algériens dans la filière lait et en particuliers ceux intéressés par le domaine des produits laitiers fermentés.
- Ce questionnaire a pour objectif de recueillir les opinions de chercheurs et experts dans le domaine des bactéries lactiques concernant les enjeux et défis liés aux ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière locale.

En raison de votre expérience de recherche dans le domaine des bactéries lactiques, nous vous prions de bien vouloir répondre aux 5 questions suivantes.

Melle LEKSIR Choubaila
Etudiante en 2^{ème} année Magister : « Biotechnologie alimentaire »
INATAA – Département de Biotechnologie Alimentaire
Université Mentouri Constantine

Section I : Informations personnelles	
Nom :	Prénom :
Université :	Faculté :
Laboratoire :	Domaine de recherche :
Section II : Votre opinion d'expert sur les enjeux et défis de l'industrie laitière en Algérie	
Q1- D'après votre expérience de recherche dans le domaine des bactéries lactiques, quels sont les aspects qui ont été abordés dans les recherches qui ont été réalisées ou sont en cours de réalisation dans les laboratoires de recherche nationaux spécialisés dans cette thématique? R1-	
Q2- Les produits laitiers <u>fermentés</u> représentent une part importante du marché national de produits laitiers. Selon vous quels sont les problèmes qui font face au développement de ces produits ? R2- <i>Problème 1 :</i> <i>Problème 2 :</i> <i>Problème 3 :</i> <i>Problème 4 :</i> <i>Problème 5 :</i>	
Q3- Comment voyez-vous l'avenir de ce secteur en Algérie ? Quels sont les aspects à améliorer/développer par ordre de priorité?	

<p>R3- <i>Priorité 1 :</i></p> <p><i>Priorité 2 :</i></p> <p><i>Priorité 3 :</i></p> <p><i>Priorité 4 :</i></p> <p><i>Priorité 5 :</i></p>
<p>Q4- Selon vous, quels sont les inconvénients et risques majeurs associés à l'importation de ces ferments de l'étranger ? Qu'est ce qui empêche la production locale de ces ferments ?</p> <p>R4-</p>
<p>Q5- Pensez-vous que les ferments génétiquement modifiés ont un avenir en Algérie ? Argumentez votre réponse SVP.</p> <p>R5-</p>
<p>Opinions supplémentaires sur le secteur de l'industrie laitière en Algérie et plus précisément sur les ferments lactiques :</p> <ul style="list-style-type: none">----
<p>Section III : Aidez-nous à améliorer la qualité de notre questionnaire</p>
<p>Comment avez-vous trouvé ce questionnaire ?</p>
<p>Vos propositions pour amélioration du questionnaire :</p>

Merci pour votre collaboration valeureuse

Annexe 7 : Résultats bruts des tests de susceptibilité aux antibiotiques**7.1. Évolution du pH des différents ferments analysés**

Ferment	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H	T6 15 :00H
YC-180 Yo-Flex®	5.47±0.01	4.78±0.01	4.69±0.02	4.64±0.01	4.62±0.01	4.60±0.02	4.48±0.02
Lyofast Y 456 B	6.12±0.04	5.03±0.03	4.97±0.03	4.83±0.02	4.80±0.03	4.75±0.04	4.52±0.03
SALSA 1	6.78±0.00	7.07±0.02	7.21±0.01	7.27±0.02	7.32±0.01	7.38±0.02	/
CHN-11	6.47±0.03	5.21±0.01	5.19±0.02	5.29±0.02	5.23±0.03	5.13±0.02	/
ALPHA 10	6.34±0.03	5.19±0.03	5.28±0.03	5.35±0.03	5.30±0.01	5.21±0.02	/

7.2. Évolution de la densité optique à 600 nm des différents ferments analysés

Ferment	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H	T6 15 :00H
YC-180 Yo-Flex®	0.1196 ±0.0023	0.2787 ±0.0018	0.2876 ±0.0004	0.2983 ±0.0014	0.3145 ±0.0022	0.3192 ±0.0016	0.3389 ±0.0017
Lyofast Y 456 B	0.0485 ±0.0024	0.1345 ±0.0026	0.1912 ±0.0003	0.2036 ±0.0032	0.2080 ±0.00031	0.2385 ±0.0025	0.3051 ±0.0026
CHN-11	0.1196 ±0.0009	0.2053 ±0.0018	0.2061 ±0.0024	0.2087 ±0.0012	0.2257 ±0.0018	0.2397 ±0.0004	0.4834 ±0.0015
ALPHA 10	0.2075 ±0.0007	0.2793 ±0.0018	0.2981 ±0.0019	0.3068 ±0.0023	0.3247 ±0.0008	0.3417 ±0.0011	0.3916 ±0.0023

7.3. Croissance cellulaire des ferments lactiques relativement à la croissance cellulaire dans l'absence des antibiotiques**7.3.1. Lyofast Y 456 B**

Concentration Pen&Strep (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
0.01	DO (%)	94.02±0.24	61.12±0.46	57.16±0.19	60.60±1.32	85.87±0.16	86.41±0.44
	pH	6.04±0.01	5.38±0.02	5.29±0.01	5.22±0.01	5.17±0.03	4.87±0.02
0.1	DO (%)	89.48±0.39	80.65±0.28	79.65±0.44	65.84±0.29	42.98±0.18	66.37±0.56
	pH	6.23±0.02	6.09±0.03	5.58±0.02	5.51±0.04	5.43±0.02	5.38±0.02
0.5	DO (%)	86.39±0.19	58.79±0.38	52.24±0.44	53.24±0.29	28.09±0.33	30.52±0.51
	pH	6.27±0.02	5.84±0.02	5.73±0.02	5.69±0.02	5.49±0.00	5.46±0.02
1	DO (%)	82.88±0.29	53.97±0.83	46.80±0.75	42.48±0.44	25.69±0.29	27.33±0.53
	pH	6.35±0.02	5.68±0.04	5.62±0.02	5.53±0.02	5.49±0.01	5.49±0.02
5	DO (%)	39.17±0.13	29.91±0.24	28.61±0.43	27.27±0.67	27.00±1.26	26.91±0.34
	pH	6.41±0.03	6.20±0.03	6.17±0.03	6.15±0.02	6.14±0.01	6.14±0.02

Concentration Sulfaprime S (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
200	DO (%)	78.76±0.29	46.82±0.56	57.32±0.84	64.88±0.51	85.06±0.39	76.93±0.40
	pH	6.47±0.02	5.27±0.02	5.11±0.03	5.04±0.02	4.90±0.02	4.88±0.02
250	DO (%)	75.25±0.83	41.62±0.26	55.64±0.57	57.02±0.56	75.26±0.62	69.35±0.87

	pH	6.50±0.01	5.29±0.02	5.12±0.02	5.09±0.04	4.90±0.02	4.86±0.01
300	DO (%)	73.60±1.12	43.05±0.74	28.66±0.53	28.43±0.55	29.39±0.56	26.24±0.28
	pH	6.52±0.03	5.95±0.05	5.79±0.02	5.63±0.04	5.47±0.02	5.45±0.02
350	DO (%)	70.30±0.27	28.59±0.43	19.76±0.28	18.71±0.44	18.82±0.67	16.64±1.93
	pH	6.55±0.02	6.49±0.02	6.47±0.02	6.45±0.02	6.44±0.02	6.44±0.04

Concentration Ampicilline (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
0.01	DO (%)	75.67±1.8	51.32±0.44	59.83±0.29	62.42±0.56	78.62±0.63	73.45±0.87
	pH	6.53±0.02	5.39±0.02	5.22±0.02	5.18±0.03	4.93±0.02	4.88±0.04
0.1	DO (%)	64.32±0.23	45.46±0.54	61.87±1.56	63.31±0.18	76.56±0.23	70.23±0.55
	pH	6.57±0.04	5.90±0.03	5.76±0.02	5.72±0.01	5.63±0.02	5.59±0.02
0.5	DO (%)	44.12±0.23	39.75±0.61	53.97±0.23	53.24±0.46	53.93±0.58	51.14±0.63
	pH	6.59±0.01	5.96±0.02	5.88±0.02	5.83±0.02	5.77±0.02	5.68±0.01

7.3.2. YC-180 Yo-Flex®

Concentration Pen&Strep (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
0.01	DO (%)	97.49±0.52	98.56±0.26	99.13±0.89	99.32±1.59	99.46±0.26	99.49±0.62
	pH	6.28±0.04	5.05±0.02	4.87±0.02	4.82±0.02	4.79±0.02	4.65±0.02
0.1	DO (%)	95.81±0.56	96.24±0.64	97.32±0.44	97.85±0.56	98.18±0.42	98.66±0.56
	pH	6.34±0.02	5.06±0.05	4.88±0.02	4.80±0.02	4.83±0.02	4.82±0.05
0.5	DO (%)	92.89±0.57	93.67±0.58	94.67±1.19	94.83±0.62	95.37±0.44	96.10±0.28
	pH	6.41±0.06	5.05±0.02	4.91±0.02	4.85±0.02	4.82±0.02	4.74±0.02
1	DO (%)	92.12±0.22	91.48±0.42	92.34±0.83	92.28±0.94	92.03±1.02	92.59±0.44
	pH	6.47±0.02	5.03±0.04	4.91±0.02	4.89±0.04	4.88±0.02	4.86±0.02
5	DO (%)	85.89±0.44	85.39±0.56	81.09±0.53	76.25±0.96	73.99±0.34	72.43±0.29
	pH	6.49±0.03	6.28±0.03	5.97±0.03	5.84±0.02	5.78±0.03	5.74±0.02

Concentration Sulfaprim S (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
200	DO (%)	99.93±0.56	93.83±0.29	94.64±0.38	95.23±0.45	96.74±0.32	97.18±0.93
	pH	5.51±0.06	4.72±0.02	4.69±0.02	4.66±0.08	4.64±0.02	4.62±0.07
250	DO (%)	87.93±0.97	89.76±0.42	88.94±0.57	88.97±1.56	89.18±0.62	92.17±0.46
	pH	5.73±0.09	4.75±0.06	4.73±0.07	4.69±0.02	4.65±0.06	4.63±0.02
300	DO (%)	79.84±0.19	71.92±0.58	72.58±0.18	78.76±0.27	83.54±0.18	91.32±0.57
	pH	5.96±0.02	4.86±0.12	4.72±0.06	4.69±0.04	4.67±0.08	4.65±0.10
350	DO (%)	79.68±0.44	71.51±0.73	88.17±0.55	92.55±0.46	92.53±0.69	95.55±0.54
	pH	6.17±0.08	4.92±0.06	4.83±0.02	4.80±0.05	4.75±0.02	4.71±0.06

Concentration Ampicilline (µl/ml)		T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
0.01	DO (%)	80.00±0.44	93.97±0.60	95.30±0.24	94.36±0.32	94.75±0.09	97.83±0.64
	pH	6.31±0.07	4.67±0.09	4.65±0.07	4.61±0.06	4.59±0.05	4.55±0.02
0.1	DO (%)	78.09±0.38	92.83±0.29	94.47±0.37	93.59±0.46	90.71±0.17	93.37±0.86
	pH	6.41±0.06	5.03±0.11	4.74±0.08	4.71±0.04	4.63±0.02	4.57±0.03
0.5	DO (%)	77.25±0.59	91.31±0.76	92.73±0.46	87.56±0.25	86.23±0.74	91.22±0.55
	pH	6.43±0.02	5.23±0.07	5.02±0.03	4.89±0.05	4.76±0.12	4.72±0.07

7.3.3. ALPHA 10

Concentration Pen&Strep (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
0.1	98.69±0.38	98.99±0.23	96.04±0.18	92.43±0.56	91.98±0.43	91.19±0.32
1	97.01±0.12	97.88±0.19	93.35±0.27	90.80±0.44	89.12±0.29	87.21±0.37
10	95.51±0.38	97.49±0.26	92.04±0.67	89.73±0.37	86.54±0.26	81.53±0.44
100	92.19±0.29	97.09±0.24	90.07±0.46	89.62±0.39	85.57±0.37	73.25±0.58
200	89.38±0.54	95.57±0.15	89.76±0.48	85.77±0.27	79.49±0.26	68.14±0.10

Concentration Sulfaprime S (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
200	99.72±0.44	98.83±0.35	98.67±0.29	98.53±0.13	98.29±0.24	98.11±0.93
250	99.67±0.13	98.76±0.27	98.45±0.19	98.36±0.44	98.18±0.54	97.93±0.15
300	99.53±0.18	98.56±0.24	98.35±0.23	98.20±0.24	98.03±0.32	97.86±0.44
350	99.14±0.35	97.87±0.32	97.72±0.24	97.41±0.14	97.29±0.44	97.05±0.44

Concentration Ampicilline (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
1	95.12±0.29	94.43±0.44	93.78±0.92	93.65±0.13	93.27±0.15	92.36±0.25
2	92.65±0.73	91.69±0.22	90.53±0.24	90.32±0.37	90.17±0.12	89.35±0.57
5	86.15±0.17	74.32±0.27	71.87±0.29	69.51±0.74	64.94±0.32	62.46±0.65
10	78.13±0.33	69.76±0.29	63.93±0.28	60.76±0.42	58.14±0.22	53.84±1.27

7.3.4. CHN-11

Concentration Pen&Strep (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
1	98.82±0.44	96.45±0.29	94.23±0.13	93.87±0.27	91.73±0.28	87.97±0.29
10	98.00±0.28	85.19±0.34	94.36±0.44	94.13±0.25	92.29±0.46	84.02±0.31
100	95.23±0.28	81.92±0.24	81.64±0.48	80.16±0.52	78.95±0.43	77.12±0.45
200	92.18±0.27	79.43±0.46	76.87±0.51	74.39±0.44	72.90±0.18	70.13±0.17

Concentration Sulfaprime S (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
200	98.43±0.44	98.17±0.42	97.87±0.27	97.16±0.15	96.93±0.23	96.71±0.17
250	98.27±0.53	97.83±0.29	97.52±0.49	97.38±0.28	96.73±0.27	96.52±0.14
300	97.83±0.12	97.57±0.43	97.38±0.26	97.16±0.15	96.92±0.44	96.63±0.12

350	95.53±0.27	95.37±0.49	95.94±0.54	95.73±0.48	95.41±0.58	95.28±0.57
Concentration Ampicilline (µl/ml)	Viabilité des ferments (%)					
	T0	T1 2:00H	T2 3:00H	T3 3 :30H	T4 4 :30H	T5 5 :30H
1	93.83±0.44	91.15±0.32	89.57±0.74	89.12±0.15	87.60±0.32	85.52±0.93
2	83.92±0.18	80.54±0.27	78.65±0.43	74.30±0.19	72.17±0.72	69.47±0.82
5	81.12±0.63	79.73±0.18	75.84±0.37	73.27±0.93	70.29±0.27	69.18±0.63
10	75.75±0.83	73.18±0.47	70.12±0.27	69.94±0.45	66.43±0.28	62.84±0.19

Annexe 8 : Taxonomie des espèces étudiées (De Vos et al., 2009)

Streptococcus salivarius ssp. thermophilus**Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Coccus**Ordre :** Lactobacillales**Famille :** Streptococcaceae**Genre :** Streptococcus**Espèce :** *Streptococcus thermophilus***Sous espèce :** *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus****Lactobacillus delbrückii ssp. Bulgaricus*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Bacilli**Ordre :** Lactobacillales**Famille :** Lactobacillaceae**Genre :** Lactobacillus**Espèce :** *Lactobacillus delbrückii***Sous-espèce :** *Lactobacillus delbrückii bulgaricus****Lactococcus lactis ssp. cremoris*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Bacilli**Ordre :** Lactobacillales**Famille :** Streptococcaceae**Genre :** *Lactococcus***Espèce :** *Lactococcus lactis***Sous espèce :** *Lactococcus lactis ssp. cremoris****Lactococcus lactis ssp. lactis*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Bacilli**Ordre :** Lactobacillales**Famille :** Streptococcaceae**Genre :** *Lactococcus***Espèce :** *Lactococcus lactis***Sous espèce :** *Lactococcus lactis ssp. lactis****Lactococcus biovar ssp. diacetylactis*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Bacilli**Ordre :** Lactobacillales**Famille :** Streptococcaceae**Genre :** *Lactococcus***Espèce :** *Lactococcus lactis***Sous espèce :** *Lactococcus lactis ssp. lactis biovar diacetylactis****Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :****Ordre :****Famille :****Genre :** *Leuconostoc***Espèce :** *Leuconostoc mesenteroides***Sous espèce :** *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris****Staphylococcus xylosus*****Règne :** Bacteria**Division :** Firmicutes**Classe :** Bacilli**Ordre :** Bacillales**Famille :** *Staphylococcaceae***Genre :** *Staphylococcus***Espèce :** *Staphylococcus xylosus*

Annexe 9 : Localisation et identification des entreprises ayant participé à l'enquête Delphi

9.1. Situation géographique



Figure A9.1: Positionnement géographique des unités de production laitière ciblées par l'enquête Delphi [Source : Google Earth 2012].

9.2. Liste des participants

Tableau A9.2.1 : Entreprises ayant participé à notre enquête.

Unité de production	Siège social
<i>Safilait</i>	Constantine
<i>Grouz</i>	Mila
<i>Hodna lait</i>	M'sila
<i>Idough</i>	Annaba
<i>Igilait</i>	Jijel
<i>Candia</i>	Bejaïa
<i>La Guelmoise</i>	Guelma
<i>STLD</i>	Tizi Ouzou
<i>Danone</i>	Bejaïa
<i>Milk Rhumel</i>	Constantine

Tableau A9.2.2 : Profils des chercheurs ayant participé à notre enquête.

Établissement	Faculté	Laboratoire	Domaine de recherche
Université d'Oran	Sciences	Biologie des Microorganismes et Biotechnologie	Bactéries lactiques
Université d'Oran	Sciences	Microbiologie appliquée	Bactéries lactiques
Université de Jijel	Sciences exactes Sciences de la nature et de la vie	Pharmacologie et Phytochimie	Bactéries lactiques : intérêts technologiques et probiotiques
Université Mentouri Constantine	INATAA	Alimentation, Nutrition et Santé	Bactéries lactiques
Université d'Alger	ENP Alger	Science et Techniques de l'Environnement	Biotechnologie alimentaire et environnementale
USTHB, Alger	Génie des procédés	Sciences de génie des procédés industriels	Génie alimentaire et génie de l'environnement
Université Hassiba Benbouali, Chlef	Sciences agronomiques et biologiques	Bioressources Naturelles Locales	Bioproduits
Université Badji Mokhtar, Annaba	Sciences	Microbiologie et biochimie appliquée	Microbiologie appliquée

Thème : «**Caractérisation et le contrôle de la qualité de ferments lactiques utilisés dans l'industrie laitière algérienne**».

Nature du diplôme : **Magister en Sciences Alimentaires**

Option : **Biotechnologie Alimentaire**

Résumé

La fabrication de produits laitiers fermentés nécessite l'incorporation de quantités importantes de ferments lactiques importés. La robustesse des ferments par rapport aux fluctuations des paramètres opérationnels des procédés industriels est un critère de qualité qui est prisé par les opérateurs industriels. De ce fait, les souches les plus performantes sous les conditions industrielles hostiles auront tendance à être sélectionnées dans les opérations de criblage des souches industrielles. Les souches démontrant une résistance aux antibiotiques en sont un exemple. L'antibiorésistance peut être innée ou acquise suite à l'exposition d'une souche particulière à des antibiotiques. L'utilisation des antibiotiques dans la production animale est considérée comme la principale cause de la sélection pour l'antibiorésistance chez les bactéries qui peuvent ensuite se retrouver sur des denrées alimentaires. Plusieurs études scientifiques soutiennent l'hypothèse d'un lien entre l'utilisation des antibiotiques dans le secteur de la production primaire et l'émergence d'une antibiorésistance chez des agents pathogènes humains, avec l'alimentation comme moyen de transmission important.

Notre travail comporte trois parties principales : (1) contrôle de la qualité microbiologique et identification des souches bactériennes présentes dans des échantillons de ferments lactiques importés; (2) évaluation de la susceptibilité des échantillons de ferments lactiques importés à un panel de trois antibiotiques choisis pour leur utilisation dans la production laitière ; (3) consultation d'un panel d'experts scientifiques et industriels par méthode Delphi afin d'évaluer les potentialités de fabrication locale de ferments lactiques autochtones.

Nos résultats ont révélé une bonne multiplication de la majorité des souches des ferments lactiques en présence des antibiotiques testés, notamment la Sulfaprime S avec des concentrations allant jusqu'à 350 µl/ml. Ceci pourrait constituer un danger potentiel pour la santé du consommateur avec risque de transfert des gènes de résistance à la flore digestive humaine ou dans le pire des cas aux germes pathogènes. Les résultats recueillis de l'enquête Delphi laissent entendre que le développement durable de l'industrie laitière algérienne est tributaire de la disponibilité des matières premières, en particulier le lait de vache et le lait en poudre importé dont le prix est sujet aux fluctuations dans les marchés internationaux. La fabrication de ferments lactiques locaux dépendra de l'acquisition du savoir-faire technique notamment en matière de fermentation industrielle, mais aussi la maîtrise des outils modernes de caractérisation moléculaire et criblage à haut-débit afin d'identifier les alternatives viables, tant sur le plan commercial que technologique, aux ferments importés qui sont perçus favorablement par les opérateurs industriels en raison de leur fiabilité, et ce malgré les risques qui y sont associés (bactériophages, OGM, antibiorésistance ...etc.).

Mots clés: Ferments lactiques, industrie laitière locale, antibiotiques, résistance, enquête Delphi.

Theme: "**Characterization and quality control of lactic acid bacteria used in Algerian dairy industry.**"

Type of diploma: **Magister in Food Science**

Option: **Food Biotechnology**

Summary

The manufacture of fermented dairy products requires the incorporation of large amounts of imported starter cultures. The robustness of industrial starters with respect to fluctuations in operating parameters of industrial processes is a quality that is valued by industrial operators. Therefore, the most effective strains under harsh industrial conditions tend to be selected in the screening operations that lead to the development of industrial strains. Strains demonstrating resistance to antibiotics are but one example. Antibiotic resistance may be innate or acquired after exposure of a particular strain to antibiotics. The use of antibiotics in animal production is considered the main cause of selection for antibiotic resistance in bacteria that can then be found on food. Several scientific studies support the hypothesis of a link between the use of antibiotics in primary production and the emergence of antibiotic resistance in human pathogens, with food being a major vector of transmission.

Our work contains three main parts: (1) quality control and identification of bacterial strains present in samples of imported starter cultures, (2) evaluation of the susceptibility of imported starters to a panel of three antibiotics chosen because of their use in milk production, (3) consultation with a panel of scientific experts and industrial operators by means of a Delphi survey in order to assess the potential for local manufacture of indigenous dairy starter cultures.

Our results showed a good proliferation of the majority of strains of lactic acid bacteria present in the imported starters in the presence of the antibiotics tested, notably Sulfaprime S with a concentration of up to 350 µg/ml. This could pose a potential danger to the health of consumers, in particular the risk of horizontal transfer of the resistance genes to human intestinal flora or, in the worst case, to pathogens therein. The results collected from the Delphi survey suggest that the sustainable development of the Algerian dairy industry would depend on the availability of raw materials, especially cow's milk and imported milk powder whose price is subject to fluctuations in international markets. As for Production of indigenous dairy starter cultures, our results indicate that it would depend on the acquisition of technical know-how, in particular in the field of industrial fermentation, but also mastery of modern tools for molecular characterization and high-throughput screening in order to identify viable alternatives, both commercially and technologically, to the imported starter cultures which are perceived favorably by industrial operators because of their reliability, despite the risks associated with them (bacteriophages, GMO, antibiotic resistance ... *etc.*).

Keywords: Starter cultures, local dairy industry, antibiotic resistance, Delphi survey.

موضوع أطروحة: "توصيف ومقابلة جوبكتوي اح مضلل لابن ميسرة في صناعات لبلب ان في ال جزائر "

طبيخة هادة : اح ستي رفي لعل وم لا غناية

لكل خصص بتلولوجي غذائية جيوية

لمخص

تطلب صناعات الألبان مخمرة إدماج كيميائية لبيوية السم توردية. تباله ال خليل لبيوية هي مؤشر جودة حظوت قدير مرقبل الثم غليزل لهن اعين. ولذل كفن ال الالات الأكترف غلي قفي ظل الظروف الصناعات القاسية فتتسبب اجتم الكبر لختي ار مفي لحي ان لل فرزال مراد في هت حيدال ال لانتل صناعات. السلاطات ال قيا ومقل مضادات الحوية تبال مهم. ق تكلون ال مق او لمق مضادات الحوية ق طرية لوكت سبقت عرض سلاله م عين ل مضادات الحوية يتتعب است خدامل مضادات الحوية قفي الإنتاج لاجيولي ال سبب لهي ستي لثش وعل مق او م لل مضادات الحوية قفي لظيت يري التي مي كن ب عد ل ك ال غور علي هفي ال غذاء ال عي د من الواسات ال عفي ق تدعم فرضية و ج واصل قبي ن است خدامل مضادات الحوية قفي الإنتاج الألي وظهور قيا وم ال مضادات الحوية قفي الكائنات ال ممرض ل ن سان، م بل طعام كوسي ل ق ل م مهمة.

ينطوي عملنا على الشة أجزاع ي سريه هي: 1) مرطبة ال جودا قمي كروي لوجية و تحيدال ال لال لظيت يرية ال موجود قفي عينات ال خليل لبيوية قلام ستي وردية، 2) تقويم مدي حساسية عينات ال خليل لبيوية السم توردية القريب ال إلى الشة مضادات الحوية م ستي خ دم قفي لتاج لاج لي ب، 3) تشار لة ل جنة م ال ك خبراء ال عي ن لوطن اعين من ال است ج و اب على طرية قفي تقويم إمك لية التصرفي ال حل لي لك خليل لبيوية.

أظهرت النتائج لتي توطن الي هاتل شار حلي غ لية ال الالات من ال خليل لبيوية قلام ستي ورد قفي و جودا ل مضادات الحوية ال مقبيرة، وخاصة S Sulfaprimه م عتر لي زانتصل إلى 353 ug/ml. ومذلي مكن أن تيش كل خطرا مضا ال على ص الحتم ست هل يين يتتلف ين قال جين ات ال قيا وم ال إلى ال جري م لام عي ل لسان أوفي أسوأ الأحوال ال جري م لامبيرة ال مر اضت شير ال قتل جال تي تم جم عها من است ج و اب قفي إلى أن لتقي قلام ستي دام ق ل صناع ال لبان في ل اجزائرت عي م على فرة ال مواد الخام، وخاصة حلبي اللقور ليا حلبي بل لم جف لام ستي ورد ال الذي يخض عس عره تلق ليات قفي الأسواق لدولية. لتاج ال خليل لبيوية عي م على لكس البت قرية ولد رية، خاص قفي م جال التخيير الصناعاتي، والتي مكن من أدوات الحية غلية الإنتاج التي مكن من التوصيف لاجويي ول فرزلت حيد بطل فعالة، تاج اري وقوي، لل خليل لبيوية السم توردية التي نالبتت حس ان الثم غليزل الصناعات اعين بسبب قتيها، على لرغم من لم خاطر لم يتب طبها ال مق او لمق مضادات الحوية ... الخ.)

للظم انتقليات حية: ال خليل لبيوية، صناعات الألبان الحلية، القيا ومقل مضادات الحوية، نواس قتلوق ص ل يدي قفي.