



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen
Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre et de
l'univers

Département de Biologie
*Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au Biomédical
et à l'Environnement (LAMAABE)*



Thèse

En vue d'obtention du diplôme

Doctorat en Sciences biologique

Option : MICROBIOLOGIE

Intitulé de la thèse :

**Identification et caractérisation de spores de *Bacillus cereus*
isolées de fromages fondus fabriqués en Algérie.**

Présentée par:

Rym Nouria BENAMARA

Soutenu le: 29/04/2017.

Devant le Jury composé de :

Président :	M ^r DJAZIRI R.	- Professeur, Université de Tlemcen
Examineur :	M ^r KIHAL M.	- Professeur, Université d'Oran
Examineur :	M ^r MEDDAH B.	- Professeur, Université de Mascara
Examineur :	M ^r HADDADJI M.	- Professeur, Université d'Oran
Examineur :	M ^r BARKA M.S.	- MCA, Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	M ^r MOUSSA BOUDJEMAA B.	- Professeur, Université de Tlemcen

Année universitaire : 2016-2017

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) sous la direction de **M. Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA**, Professeur de Microbiologie au département de Biologie, Université de Tlemcen ainsi que le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne ; Site de Quimper (LUBEM) sous la direction de **M. Ivan LEGUERINEL** Professeur à l'université de Brest, France.

Je remercie tous d'abord **Pr Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA** pour son encadrement efficace et rigoureux en tant que directeur de thèse et je le remercie très chaleureusement pour son aide, sa disponibilité, pour avoir été un guide précieux et pour ses judicieux conseils.

J'exprime mes vifs remerciements à **M^r Rabeh DJAZIRI**, Professeur à l'université de Tlemcen, qui a bien voulu accepter de présider ce jury.

Je tiens à remercier très particulièrement **M^r Mebrouk KIHAL**, Professeur à l'université d'Oran 1 Ahmed BenBella, qui a accepté de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse gratitude et de mon profond respect.

Je remercie **M^r Boumediene MEDDAH**, Professeur à Université Mustapha Stambouli de Mascara, **M^r Miloud HADDADJI**, Professeur à l'université d'Oran 1 Ahmed BenBella et **M^r Mohamed Salih BARKA**, Maître de conférences classe A à l'université de Tlemcen, d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond respect et l'expression de mes vifs remerciements

Mes vifs remerciements vont également au **P^r Ivan LEGUERINEL**, pour son aide précieuse. Qu'il me soit permis de lui prouver ma profonde reconnaissance pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Je tiens également à exprimer ici ma profonde gratitude à celui qui a toujours encouragé mes aspirations scientifiques et m'a toujours conseillé **M^r Djamel SAIDI**, Professeur à l'université d'Oran 1 Ahmed BenBella, Vice-recteur chargé de la Post-graduation et de la Recherche Scientifique. Qu'il trouve dans cette thèse le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance et mes vifs remerciements à **M^r Carlin FREDERIC**, Professeur et directeur adjoint, du centre de recherche INRA d'Avignon. Ainsi à **M^r Yann DEMARIGNY**, Professeur à l'ISARA, Université Lyon 1 pour son aide précieuse et pour sa disponibilité.

Je remercie également et vivement **M^r Mohammed DAHANE**, Maître de conférences au laboratoire de Génie industriel et de Production Metz, France pour son aide et son soutien.

Je voudrais également remercier **M^{elle} Bouchra EL KHALFI**, Assistant Professeur ainsi **M^r Abdelaziz SOUKRI**, Professeur et directeur du Laboratoire de Physiologie et de Génétique Moléculaire, Faculté des Sciences Ain chock Université Hassan II Casablanca (Maroc) pour leur aide dans la réalisation de ce travail sans oublier **M^{me} Sanaa ALAOUI**, Ingénieur à la plateforme de Biologie moléculaire et Génomique Fonctionnelle, UATRS, CNRST, Rabat (Maroc) pour l'effort qu'elle a fourni pour mon travail.

Mes remerciements vont également à **M^{me} Dalila LAKHDAR ABDELDJALIL** et **M^r Kada IBRI**, Maîtres assistants de classe A à l'Université Mustapha Stambouli de Mascara, et à qui je n'oublierai pas d'exprimer mon immense gratitude.

Je tiens à remercier **M^{elle} Z. MADANI**, **M^{me} H. RIANE**, **M^r A. LARBAOUI**, **M^{me} N. BENOUAZ**, **M^r A. HARIRI**, **M^r D. BOUHADI**, **M^{me} O. BENZAATAR**, **M^{me} O. BOUKHARI** et **M^r Y. BOUKHARI**, enseignants à l'université Mustapha Stambouli de Mascara, pour leur aide dans la réalisation de cette thèse. Sans oublier de remercier très chaleureusement **M^r M. BOUGHERS** et **M^r M. LARID** ainsi que tout le personnel de la direction du commerce et du CACQE de la wilaya de Naâma ainsi que le Directeur du commerce de la wilaya d'Oran et son personnel pour leur précieuse aide.

Un grand Merci à mes ami (e) s., **M^{elle} M. BENAHMED** et sa famille, **M^{elle} F.Z. GHANEMI**, **M^{elle} N. ILES**, **M^{elle} K. MEDJAHDI**, **M^r M. ZIANE** et **M^r I. BENAMAR** qui m'ont aidé à réaliser cette thèse de Doctorat. A travers eux, je remercie tous les membres du laboratoire de LAMAABE surtout l'équipe 4.

Je remercie enfin tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A Dieu tout puissant, de m'avoir donné la chance pour poursuivre mes études et qui m'a donné la volonté et la patience pour faire ce modeste travail.

A ma mère qui n'a cessé de donner d'elle-même pour que je sois heureuse et qui m'a toujours encouragée dans les moments les plus difficiles.

A mon père qui m'a beaucoup aidée afin de réaliser ce travail avec ses précieux conseils et ses remarques pertinentes.

A ma chère grand- mère.

A mes oncles et tantes.

A mes frères et sœurs.

A mes cousins et cousines.

A mes neveux et nièces.

A mes amis (ies).

Aux membres du LAMAABE, LUBEM et Université Mustapha Stambouli de Mascara.

A tous mes collègues et chers amis (ies),

Table des matières

Liste des tableaux	I
Liste des figures	II
Liste des abréviations	V
ملخص	VI
Résumé	VII
Abstract	VIII

Introduction	1
--------------------	---

PARTIE I: Partie bibliographique

Chapitre 1

I.1. Fromage fondu	4
I.1.1. Historique	4
I.1.2. Définitions normatives et réglementaires	4
I.1.3. Les différents types des fromages fondus	6
I.1.4. Caractéristiques des fromages fondus	7
I.1.4.1. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques	7
I.1.4.2. Caractéristiques microbiologiques	11
I.1.5. Fabrication des fromages fondus	13
I.1.5.1. Préparation des matières premières	15
I.1.5.2. Mélange, cuisson et fonte	15
I.1.5.3. Stabilisation thermique de la pâte	15
I.1.5.4. Crémage	15
I.1.5.5. Conditionnement du fromage fondu	15
I.1.5.6. Refroidissement du produit fini	16
I.1.5.7. Stockage du produit	16
I.1.6. Défauts de fabrication de fromage fondu	16
I.1.6.1. Défauts d'origine chimique ou physique	16
I.1.6.2. Défauts d'origine microbiologique	17

Chapitre 2

I.2. <i>Bacillus cereus</i>	20
I.2.1. Description et taxonomie.	20
I.2.2. Caractéristiques générales	21
I.2.3. Ecologie et habitat	23
I.2.4. La spore de <i>Bacillus cereus</i>	26
I.2.4.1. Thermorésistance des spores de <i>Bacillus cereus</i>	26
I.2.4.2. Germination des spores de <i>B. cereus</i>	27
I.2.5. Pathogénéicité de <i>Bacillus cereus</i>	28
I.2.5.1. Les entérotoxines et le syndrome diarrhéique associé	29
I.2.5.2. La toxine émétique et le syndrome émétique	33
I.2.6. Problèmes causés par <i>Bacillus cereus</i> dans les industries laitières	36
I.2.7. Les traitements thermiques	37
I.2.8. Facteurs influençant la thermo-résistance	39

PARTIE II. Matériels et méthodes

II. 1. Origine des échantillons de fromage fondu.....	40
II.2. Analyses physico-chimiques et biochimiques de fromage fondu	42
II.2.1. Détermination de l'extrait sec total	42
II.2.2. Détermination de la matière Grasse par la méthode butyrométrique de VAN GULIK	42.
II.2.3. Détermination de la teneur en protéines par titration au formol	43
II.2.4. Détermination de la matière minérale (Cendres).....	44
II.2.5. Détermination de l'acide D et L- lactique	44
II.2. 6. Détermination du pH.....	45
II.2.7. Détermination de l'activité de l'eau (a_w)	46
II.2.8. Détection de produits amylacés dans les fromages fondus	46
II.3. Analyses bactériologiques	46
II.3.1. Préparation des échantillons pour l'analyse	46
II.3.2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 30°C.....	47
II.3.3. Dénombrement de <i>Bacillus cereus</i>	48
II.3.3.1. L'étude des caractères morphologiques des isolats retenus	49
II.3.3.2. Etude des caractères physiologiques et biochimiques des isolats	49
II.3.4. Préparation des suspensionssporales de <i>Bacillus cereus</i>	49
II.3.5. Identification moléculaire des isolats	50
II.3.5.1. Extraction d'ADN bactérien.....	50
II.3.5.2. Amplification d'ADNr 16S	51
II.3. 5.3. Révélation de produits de PCR sur gel d'agarose à 1%	52
II.3.6. Détermination des valeurs minimales du pH et d' a_w de croissance de <i>Bacillus cereus</i>	53
II.3.7. Étude de la thermorésistance de spores de <i>Bacillus cereus</i>	53
II.3.7.1. Traitement thermique des spores de <i>Bacillus cereus</i>	53
II.3.7.2. Étude de l'effet du pH sur la thermorésistance de <i>Bacillus cereus</i>	54
II.3.7.3. Détermination de la thermorésistance de <i>B. cereus</i> dans le fromage fondu.....	55
II.3.7.4. Détermination des paramètres de la thermorésistance	56
II.3.8. Détection de toxines de souches de spores de <i>Bacillus cereus</i>	57
II.4. Analyse statistique.....	58

PARTIE III. Résultats et discussion

III. 1. Résultats des analyses physicochimiques des fromages.....	59
III. 1. 1. Extrait sec total (EST).....	59
III. 1.2. Teneur en Matières grasses(MG) et rapportG/S	61
III. 1.3. Taux de protéines	64
III. 1. 4. Taux de cendres.....	65
III. 1. 5. Teneur en acide lactique.....	67
III. 1. 6. Le pH.....	68
III. 1. 7. Activité d'eau (a_w)	69
III. 1. 8. Détection de produits amylacés dans les fromages.....	71
III. 2. Résultats et discussion des analyses bactériologiques	71
III. 2.1. Résultats de dénombrement de la flore totale et de <i>B. cereus</i> dans les fromages fondus étudiés.....	71
III. 2.2. Caractérisation des isolats présumés appartenir au groupe <i>Bacillus cereus</i>	76

III. 2.2.1. Caractérisation morphologique	76
III. 2.2.2. Caractérisation physiologique et biochimique	78
III. 2.3. Identification moléculaire des <i>Bacillus cereus</i> isolats présumés <i>B. cereus</i>	78
III. 2.3.1. Vérification de la qualité de l'ADN	78
III. 2.3.2. Amplification et séquençage de l'ADNr 16S	78
III. 2. 4. Détermination des valeurs minimales du pH et d'a _w de croissance de <i>Bacillus cereus</i>	79
III.2.5. Étude de la thermorésistance des spores de <i>B. cereus</i>	81
III.2.5.1. Détermination des paramètres de thermorésistance	81
III. 2.5.2. Étude de l'effet du pH sur la thermorésistance de spores de <i>B.cereus</i>	83
III. 2.5.3. Détermination de la thermorésistance de <i>B. cereus</i> dans le fromage fondu	84
III. 2.6. Détection de toxines de souches de spores de <i>B. cereus</i>	85
Conclusion	87
Références bibliographiques	89
Annexes	109

Liste des tableaux

Tableau 1:	Caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus en portions	08
Tableau 2:	Principaux défauts d'origine physico-chimique	18
Tableau 3:	Diversité génétique et écologique de <i>B. cereus</i>	22
Tableau 4:	Présence de <i>Bacillus cereus</i> dans quelques denrées alimentaires	25
Tableau 5:	Caractéristiques des intoxications alimentaires dues à <i>Bacillus cereus</i>	30
Tableau 6:	Effets des enzymes produites par <i>Bacillus cereus</i> sur la qualité organoleptique du lait et des produits laitiers	38
Tableau 7:	Composition et concentration des solutions de PCR Master Mix 50 μ L	52
Tableau 8:	Les conditions d'amplification des produits PCR.	52
Tableau 9:	Les amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude	58
Tableau 10:	Caractérisation physicochimique des fromages fondus étudiées	60
Tableau 11:	Dénombrement de la flore aérobies mésophiles totales et <i>B. cereus</i> pour les sept marques de fromages fondu étudiées.	72
Tableau 12:	Matrice de corrélation (r de Pearson)	76
Tableau 13:	Valeurs de pH et aw minimales de six souches de <i>Bacillus cereus</i> isolées de six marques de fromage fondu fabriqué en Algérie	80
Tableau 14:	Valeurs de D estimées (min). Z _T (°C) pour les spores de <i>B. cereus</i> isolés à partir de fromages fondus; température comprise entre 100 et 125 ° C	82
Tableau 15:	La thermorésistance de <i>Bacillus cereus</i> LMBCF002 étudié à différents pH au cours du traitement thermique à 102°C	84

Liste des figures

Figure 1:	Facteurs intervenant sur les caractéristiques des fromages fondus	11
Figure 2:	Diagramme de fabrication du fromage fondu	14
Figure 3:	La position phylogénétique des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> , sur la base des séquences	20
Figure 4:	Les différents cycles de vie dans différents hôtes des souches de <i>Bacillus cereus</i>	24
Figure 5:	Organisation génétique de l'opéron hbl et schématisation du devenir post- traductionnel des différents composants de la toxine Hbl.	31
Figure 6:	Organisation génétique de l'opéron nhe et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Nhe	32
Figure 7:	La structure chimique de la toxine céréulide [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val] ₃ ,	34
Figure 8:	Représentation schématique des infections à <i>Bacillus cereus</i> chez l'homme	35
Figure 9 :	Processus de fabrication de fromage fondu utilisé : L'exemple de la marque de marque B.	41
Figure 10 :	Protocole de préparation de dilutions en cascade et d'ensemencements.	48
Figure 11 :	Protocole expérimental utilisé pour l'étude de la thermorésistance des spores de <i>Bacillus cereus</i> dans le bouillon nutritif.	55
Figure 12 :	Protocole expérimental utilisé pour l'étude de la thermorésistance des spores de <i>Bacillus cereus</i> dans le fromage fondu.	57
Figure 13 :	Taux d'extrait sec total EST des différents fromages fondus étudiés.	59
Figure 14 :	Teneur en matière grasse: MG (A) et rapport G/S (B) des différents fromages fondus étudiés.	62
Figure 15 :	Détermination du taux de protéines des différents fromages fondus étudiés.	64
Figure 16 :	Taux des cendres dans les fromages fondus étudiés	66

Figure 17 :	Teneur en acide lactique des différents fromages fondus étudiés.	68
Figure 18 :	Valeurs de pH des différents fromages fondus étudiés.	69
Figure 19 :	Valeurs mesurées de aw obtenues des différents fromages fondus étudiés	70
Figure 20 :	Représentation des caractéristiques des fromages par l'application de l'ACP et la projection des individus.	75
Figure 21 :	Observation microscopique de souche présumée <i>Bacillus cereus</i> isolée d'un des fromages fondus étudiés après coloration de Gram (x12500): (photo A) et coloration de spores au vert de malachite (x12500) (photo B).	77
Figure 22 :	Amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches présumées de <i>Bacillus cereus</i> .	79
Figure 23 :	Courbe de survie de quatre souches de spores de <i>Bacillus cereus</i> isolées de quatre marques de fromage fondu Algérien	82
Figure 24 :	Effet de variation de pH sur la thermorésistance de souche LMBCF002 de <i>Bacillus cereus</i> à 102°C	84
Figure 25 :	Détermination de la thermorésistance de <i>B. cereus</i> dans le fromage fondu Algérien, LMBCF002, LMBCF004 et LMBCF006 <i>B.cereus</i> à 110°C (A), LMBCF004 <i>B. cereus</i> à 120°C (B).	85
Figure 26 :	Détection des toxines produites par les souches de <i>Bacillus cereus</i> groupe III isolés de fromage fondu fabriqué en Algérie.	86

Liste des abréviations

AA	Acide aminé
A.C.I.A	Agence Canadienne de l'Inspection des Aliments
ACP	Analyse en composantes principales
ADNr	Acide désoxyribonucléique ribosomique
AFNOR	Association française de normalisation
AGS	Acides gras saturés
Ala	Alanine
ANSES	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ATCC	American Type Culture Collection
a_w	Activité d'eau
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Outil de recherche d'alignement local de base)
BHI	Brain Heart Infusion (Bouillon cœur-cervelle)
C. C. I. L	Centre Canadien d'Information Laitière
CACQE	Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage
CES	Cérealide synthétase
CIQUAL	Centre Informatique pour la qualité des aliments – France.
CNIS	Centre National de l'Informatique et des Statistiques – Algérie.
CNRC	Centre National du Registre du Commerce – Algérie.
CNRST	Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique
Cyt K	Cytotoxine k
D ou DT	Temps de réduction décimale de la population bactérienne.
D-GPT	D-glutamate-pyruvate transaminase
DPA	Dipicolinic acid
EFSA	European Food Safety Authority
FAMT	Flore Mésophile Aérobie Totale
FNA	Fortified Nutrient Agar
G/S	Gras sur sec
Hbl	Hémolysine BL
HPH	Hautes Pressions Hydrostatiques
INRA	Institut national de la recherche agronomique - France
JORADP	Journal Officiel de La République Algérienne.
JORF	Journal Officiel de La République Française.
kb	kilobase
kDa	Kilo Dalton
Leu	Leucine
Min. Com.	Ministère du Commerce Algérien
mL	Millilitre

MPa	mégapascal
N	Normalité
NA	Norme Algérienne
NAD⁺	Nicotinamide-adénine dinucléotide
NADH	Nicotinamide adénine dinucleotide réduite
NF EN ISO	Normes françaises reprises dans la collection européenne
Nhe	Non-Haemolytic Enterotoxin.
panC	Pantothenate synthétase
PCA	Plate Count Agar
PCR	Polymerase chain reaction
PME	Petite et moyenne entreprise
PNA	Programme National pour l'Agriculture – France.
PNNS	Programme National Nutrition Santé – France.
QSP	Quantité suffisante pour
SDS	Dodécylsulfate de sodium
sp	Specie
TAE	Tris, Acétate, EDTA
TIAC	Toxi-infections alimentaires collectives
Tris	Tris hydroxyméthyl aminométhane
TPE	Très petite entreprise
TSE	Tryptone Sel eau
UE	Union Européenne
UFC	Unité formant colonie
UHT	Ultra Haute Température
μM	Micromolaire
V/V	Volume à volume
Val	Valine
Z ou Z_T	Elévation de la température permettant une réduction décimale de D.
Z_{pH}	Diminution du pH permettant une réduction décimale de D.

الملخص

يعتبر الجبن الذائب من أكثر الأجبان شيوعا في الجزائر بالمقابل يمكن لهذا المنتج أن يتسبب في تسمم مستهلكيه و يرجع السبب الى البكتيريا المقاومة للحرارة القادرة على تشكيل الأبواغ، لهذا ارتأينا اجراء هذه الدراسة التي تهدف الى تحديد خصائص بكتيريا الأبواغ نوع *Bacillus cereus* المعزولة من عينات الجبن الذائب المصنع و الموزع في الجزائر.

أخذنا خمسة و ستون عينة ممثلة لسبع علامات تجارية مختلفة وقمنا بتحليلها ببيوكيميائيا حيث حددنا درجة حموضة الجبن، كمية الماء الحر فيه ، كمية المواد الدسمة ، البروتينات ، النشاء ، حمض اللاكتيك و كمية الرماد. بعدها قمنا بالتحليل الميكروبيولوجي حيث حددنا FMAT وبكتيريا الأبواغ نوع *B.cereus* ثم حددنا التوصيف المظهري، الجزيئي والأمني لهذه الأخيرة. أظهرت النتائج ما يلي:

- من الناحية البيوكيميائية: محتوى المادة الجافة الكلية، كمية الرماد وكمية البروتينات تتطابق مع نتائج الدراسات السابقة بخلاف درجة حموضة الجبن وكمية الماء الحر فيه التي فاقت المعايير المعروفة عادة.
- من الناحية الميكروبيولوجية: وجدنا مستويات مرتفعة من FMAT وكذلك *B.cereus* في كامل العلامات التجارية المدروسة بخلاف علامة واحدة.
- تنتمي بكتيريا *B.cereus* المعزولة من الست علامات تجارية المدروسة الى المجموعة الثالثة من مجموعات *B.cereus* و هذا حسب تقسيم (Guinebretière et al., 2010).
- تراوح معدل أدنى درجة حموضة النمو لبكتيريا *B.cereus* ما بين 4,70 و 5,10. أما كمية الماء الحر المناسبة لنمو نفس البكتيريا فتراوحت ما بين 0,940 و 0,951.
- أعطت دراسة مقاومة الحرارة في المرق المغذي لدى أربع أبواغ (LMBCF002، LMBCF003، LMBCF004، LMBCF006) قيم D التي تختلف من 47,02 دقيقة في درجة حرارة 105 د.م الى 1,84 دقيقة في درجة حرارة 110 د.م ، و قيمة Z_T تراوحت بين 10,80 و 22,15 د.م. أما عن قيم D في الجبن الذائب فاختلفت من 7,12 دقيقة في درجة حرارة 120 د.م و 21,53 دقيقة في درجة حرارة 110 د.م.
- أظهرت نتائج الكشف عن السموم أن فقط البكتيريا المعزولة من العينتين B و C قادرة على انتاج السموم من نوع Nhe (NheA+NheB).

في الأخير نقول أن الدراسة توصلت لإثبات تلوث عينات الأجبان الذائبة المدروسة ببكتيريا الأبواغ نوع *B.cereus* و هذا بالرغم من بسترتها أو علاجها ب (UHT) قد يرجع أصل التلوث الى تلوث المواد الأولية المستعملة كمسحوق الحليب، النشاء أو جبن الشيدر. كما أشارت هذه الدراسة الى أهمية ابراز تواجد هذا النوع من البكتيريا *B.cereus* في الأجبان الذائبة مما يحفز على وضع قوانين المراقبة الخاصة بالجبن الذائب.

الكلمات المفتاحية: الجبن الذائب، *Bacillus cereus*، البكتيريا المقاومة للحرارة، التسمم الغذائي، الأبواغ، مقاومة الحرارة.

Résumé

En Algérie, le fromage fondu est le fromage le plus populaire, mais il peut représenter un risque de toxi-infections pour le consommateur. Ce risque est principalement dû au développement des bactéries sporulées présentant une thermo-résistance élevée.

Le principal but de cette étude est de caractériser les spores de *Bacillus cereus* isolées du fromage fondu fabriqué et commercialisé en Algérie. Soixante-cinq échantillons de sept marques de fromage fondu ont été analysés sur le plan physicochimique (pH, a_w , EST, MG, acide lactique, protéines, cendres et amidon) et bactériologique (FMAT et *Bacillus cereus*). Ainsi une caractérisation phénotypique, moléculaire et sécuritaire des spores de *Bacillus cereus* isolées du fromage fondu, a été également réalisée.

Les résultats obtenus montrent que :

- Sur le plan physicochimique, les teneurs en EST, cendres et protéines concordent avec la littérature, tandis que le pH et l' a_w sont légèrement supérieurs aux normes.
- Sur le plan microbiologique, on constate que la FMAT des fromages analysés est à des taux importants et *Bacillus cereus* est présent également à des taux élevés dans les six marques de fromage étudiées.
- Les résultats obtenus montrent que les spores de *Bacillus cereus* isolées des six marques de fromage fondu appartiennent au groupe III de *B. cereus* selon la classification de Guinebretière *et al.* (2010).
- Le pH minimum de croissance obtenu pour les six souches de *B. cereus* varie entre 4,70 et 5,10, et l' a_w minimum varie entre 0,940 et 0,951.
- L'étude de la thermorésistance de quatre spores (LMBCF002, LMBCF003, LMBCF004, LMBCF006) a donné dans le bouillon nutritif des valeurs de D qui varient entre 1,84 min à 110°C et 47,02min à 105°C et les valeurs de Z_T varient de 10,80 à 22,15°C. Dans le fromage fondu, les valeurs D obtenues pour les spores isolées varient entre 7,12 min à 120°C et 21,53 min à 110°C.
- La détection de toxines a montré que seules les souches isolées des échantillons B et C produisent des toxines de type Nhe (NheA et NheB).

En conclusion, l'étude a révélé que les fromages fondus étudiés sont contaminés par des spores de *B. cereus*, en dépit de la pasteurisation ou de traitement (UHT). L'origine de la contamination peut être les matières premières telles que le lait en poudre, l'amidon ou le cheddar. L'étude a montré l'importance de faire ressortir la présence de ce germe: *Bacillus cereus* dans de tels produits, pour mieux réglementer le fromage fondu.

Mots clés : Fromage fondu, bactéries thermorésistantes, *Bacillus cereus*, toxi-infection alimentaire, spores, thermorésistance.

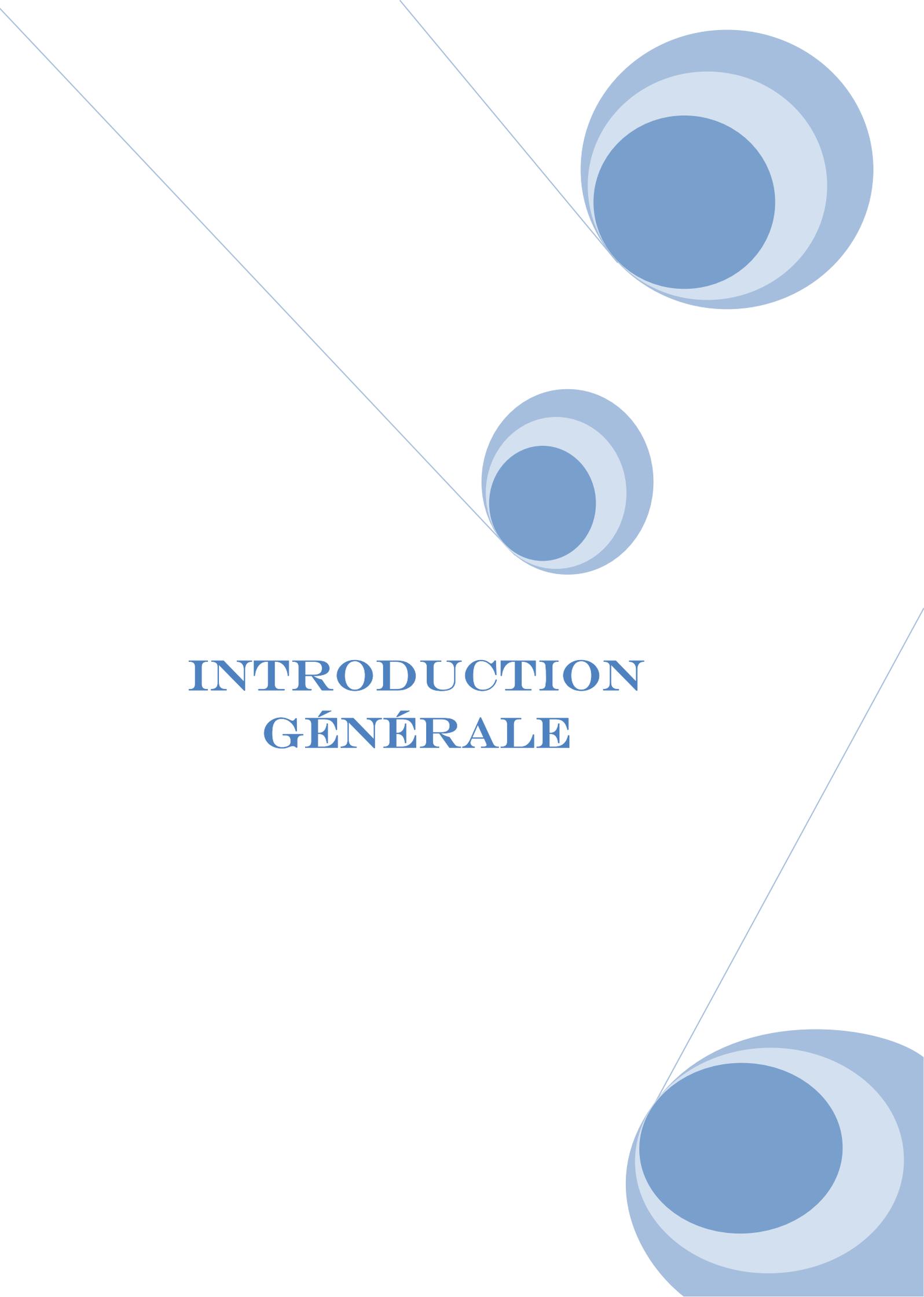
Abstract

In Algeria, processed cheese is the most popular cheese, but it can represent a food-poisoning risk to the consumer. This risk is mainly due to the development of sporulated bacteria with high heat resistance. The main objective of this study is to characterize the *Bacillus cereus* spores isolated from the processed cheese, which is manufactured and marketed in Algeria. Sixty-five samples of seven brands of processed cheese were analyzed physico-chemically (pH, aw, EST, MG, lactic acid, proteins, ash and starch) and bacteriological (FMAT and *Bacillus cereus*). So, a phenotypic, molecular and safe characterization of the isolated *Bacillus cereus*' spores from the processed cheese was also carried out. The obtained results show that:

- Physico-chemically, EST, ash and protein contents are consistent with the literature, while pH and aw are slightly above standards.
- On the microbiological level, it is observed that the FMAT of the analyzed cheeses is at high levels and *Bacillus cereus* is also present at high levels in the six brands of cheese studied.
- The obtained results show that the spores of isolated *Bacillus cereus* from the six brands of processed cheese belong to group III of *B. cereus* according to the classification of Guinebretière et al. (2010).
- The minimum pH of growth obtained for the six strains of *B. cereus* varies between 4.70 and 5.10, and the minimum aw between 0.940 and 0.951.
- The thermoresistance study of four spores (LMBCF002, LMBCF003, LMBCF004, LMBCF006) gives in the nutrient broth D values varying between 1.84 min at 110°C. and 47.02 min at 105 °C. and Z_T values range from 10.80 to 22.15 °C. In the processed cheese, the obtained D values for the isolated spores vary between 7.12 min at 120 °C. and 21.53 min at 110 °C.
- The toxins' detection showed that only isolated strains from samples B and C produced Nhe toxins (NheA and NheB).

In conclusion, the study revealed that the studied processed cheeses are contaminated with *B. cereus* spores, despite pasteurization or treatment (UHT). The contamination origin may be raw materials such as milk powder, starch or cheddar. The study showed the importance of highlighting the presence of this germ: *Bacillus cereus* in such products, to regulate the processed cheese.

Key words: Processed cheese, heat - resistant bacteria, *Bacillus cereus*, food poisoning, spores, heat resistance.

The page features a minimalist design with three overlapping blue circles of varying sizes. One large circle is in the top right, a medium one in the center, and another large one in the bottom right. A thin blue line runs diagonally from the top left towards the center, passing behind the circles. The text is centered in a blue, serif font.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Introduction générale

L'Algérie, a connu ces deux dernières décennies un fort développement des filières agro-alimentaires notamment l'industrie de transformation laitière et fromagère.

L'Algérie compte 117 unités de transformation fromagère enregistrées au centre national du registre du commerce (CNRC, 2015). Ces unités sont réparties à travers tout le territoire Algérien cependant elles ne sont pas toutes en activité.

Les fromages les plus produits et les plus consommés en Algérie sont les fromages fondus. La quantité consommée a été de 101 273 tonnes en 2015 soit une moyenne de 2,51 kg/an/habitant (CNIS, 2015).

Le marché algérien des fromages fondus est dominé par cinq marques qui détiennent environ la moitié des parts de marché. Le reste de la production est principalement concentrée dans la région d'ouest.

Les fromages fondus sont commercialisés sous plusieurs types: tartinables, en bloc et semi-liquides. Ils sont également déclinés en plusieurs saveurs.

Les meilleures marques utilisent du fromage cheddar comme matière première, mais de nombreux petits fabricants utilisent des mélanges de différentes matières premières. Le fromage fondu est basé sur une technologie beaucoup plus récente que celle du fromage traditionnel. Cette technologie stabilise les nutriments laitiers pendant une longue durée en conservant plus ou moins au produit fini l'aspect d'un fromage (Boutonnier, 2000).

Sa production nécessite le mélange, le chauffage et la texturation de produits laitiers (fromages, beurre et poudre de lait) et non laitiers (agents émulsifiants et sels). La fonte du fromage est réalisée à une température qui varie en général de 70 à 95°C pendant 4 à 15 minutes

En Algérie, le procédé consiste à mélanger plusieurs matières premières telles que le fromage cheddar, le lait en poudre, les graisses, les protéines de lait, l'amidon modifié, les sels de fonte et les régulateurs de pH. Le mélange est chauffé à 72°C à 86°C pendant 10 minutes ou à 92-94°C pendant 10 minutes pour le fromage pasteurisé tandis que pour le fromage stérilisé UHT, le traitement thermique appliqué est d'environ 140°C pendant 2-4 secondes. Ces barèmes des traitements thermiques appliqués sont généralement suffisants pour la destruction des bactéries végétatives mais peuvent être insuffisants pour éliminer les bactéries sporulées

Certaines entreprises disposent de moyens efficaces, mais de nombreux fabricants n'ont pas une maîtrise totale de l'hygiène.

Il ya donc un intérêt à évaluer le risque sanitaire lié à la consommation du fromage fondu en Algérie. Ainsi, ce type de fromage peut être la cause de toxi infections alimentaires collectives. En fait, selon les statistiques du ministère algérien du commerce les produits laitiers sont impliqués dans 9,83% des cas d'intoxications alimentaires collectives en 2015 avec 19,56% des cas dont l'agent causal reste indéterminé (Min. com, 2015). La qualité microbiologique du fromage fondu n'est pas normalisée en Algérie, il est classé avec les fromages à pâte molle. Ainsi, les micro-organismes recherchés sont les coliformes totaux, les coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sulfito-réducteurs*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* (Arrêté interministériel JORADP N°35, 1998).

Pendant sa conservation, le fromage fondu peut être sujet à des altérations dues à des re-contaminations post-traitement ou des contaminations microbiennes provenant d'un défaut d'étanchéité d'emballage, en plus des altérations organoleptiques affectant l'arôme et la texture du produit (Chambre et Daurelles in Eck et Gillis, 1997). Les germes responsables de ces altérations sont divers, Coliformes, levures et moisissures et parfois des sporulées anaérobies (Veisseyre, 1979) et des sporulés aérobies tel que *Bacillus cereus* qui fait globalement partie de la flore d'altération des produits laitiers (Gaillard, 2003) et qui peut négativement affecter la qualité et la sécurité du produit (Senesi et Ghelardi, 2010). En fait, *B. cereus* est une bactérie inévitable dans les produits laitiers (Lücking et al., 2013). *Bacillus cereus* sensu stricto est pathogène. Il est bien connu pour son potentiel toxigène avec sa capacité de production de deux types de syndromes d'intoxication alimentaire, un type émétique par la production de la céréulide (Senesi et Ghelardi, 2010) et un type diarrhéique par la production de plusieurs entérotoxines: Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K) (Samapundo et al., 2011; Jeßberger, 2014). *Bacillus cereus* est toxigène à des concentrations de 10^4 à 10^5 spores/g du produit (Salustiano et al., 2009).

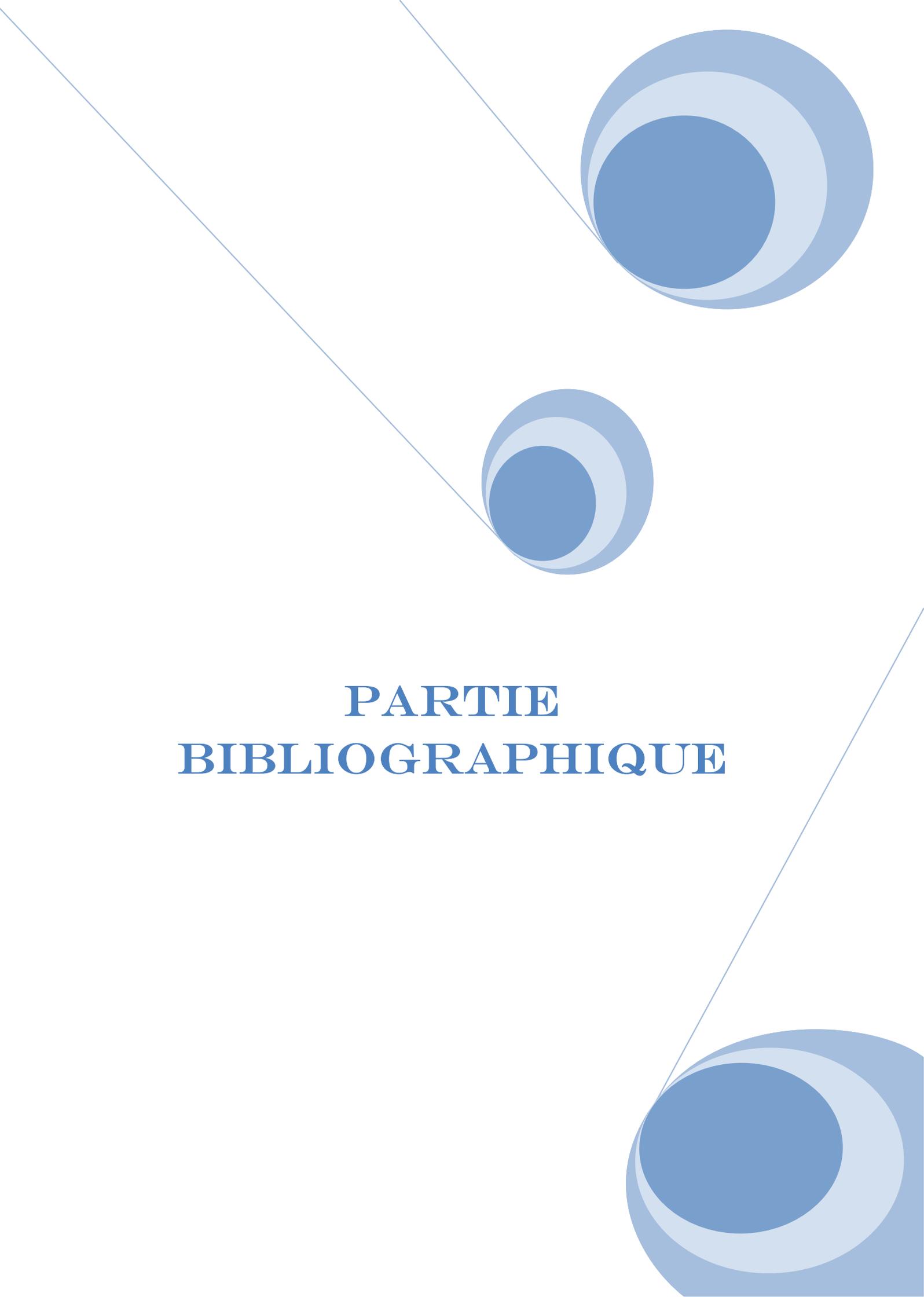
En Algérie *B. cereus* n'a pas été étudié comme agent causal de TIAC dans les produits laitiers. Jusqu'à présent, il n'y a pas de travaux en Algérie qui ont rapporté la présence de *Bacillus cereus* et ses toxines dans le fromage fondu. Alors que certains travaux montrent la présence et la persistance de cette bactérie au cours de fabrication du fromage cheddar qui est le fromage de base pour la fabrication du fromage fondu (Helmy et al.;1984 in Molva et al., 2009), la poudre de lait qui représente une des matières premières majoritaires dans la fabrication des fromages fondus et l'amidon modifié (Lücking et al., 2013).

Dans ce contexte, ce travail vise la recherche de *B. cereus* dans le fromage fondu commercialisé, l'étude de sa thermorésistance, et l'influence de certains facteurs (a_w et le pH) sur les capacités de croissance ainsi que la détection de certaines toxines de *Bacillus cereus*.

L'objectif de cette thèse est:

- D'une part, évaluer la contamination microbienne globale de certaines marques de fromage fondu commercialisées en Algérie et plus précisément au niveau de la wilaya de Mascara. Identifier la flore thermorésistante dominante notamment *Bacillus cereus* présente dans ces marques par des méthodes analytiques et moléculaires (PCR et séquençage).
- D'autre part, étudier la thermorésistance des souches isolées, déterminer des courbes de survie, calcul des paramètres D et Z, déterminer l'effet du pH sur leur thermorésistance, et les valider dans le fromage fondu, enfin la capacité de production de toxines notamment l'entérotoxine HBL (hblD et hblA), l'entérotoxine Nhe (NheA et NheB) et la cereulide pour les souches isolées sera vérifiée.

Pour cerner l'objectif dans lequel s'in srit cette thèse, nous avons subdivisé notre manuscrit en trois parties. La première partie de ce manuscrit est consacrée à une revue bibliographique sur le fromage fondu et sa contamination notamment avec les bactéries thermorésistantes (*Bacillus cereus*) et son pouvoir toxigène. La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes mises en place pour le protocole expérimental. Enfin, la troisième et la dernière partie de ce manuscrit fait état de la synthèse des résultats et leur interprétation.

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes and two thin blue lines. One line runs diagonally from the top-left towards the center, and another runs diagonally from the top-right towards the center. The circles are positioned at the top-right, center, and bottom-right of the page. Each circle is composed of three concentric layers: a dark blue inner circle, a medium blue middle ring, and a light blue outer ring.

**PARTIE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. Partie bibliographique : Chapitre 1

I.1. Le fromage fondu

I.1.1. Historique

Le lait étant très périssable, le fromage a été l'un des premiers moyens de sa conservation. Cependant, même le fromage n'offre qu'une stabilité relative et variable (Richonnet, 2016).

C'est à deux industriels suisses, Walter Gerber et Fritz Stetter, que peut être attribuée en 1911 la paternité de la fabrication industrielle du fromage fondu à Thun (canton de Berne) à partir de citrate de sodium et d'emmental (Roustel, 2014). Cependant, les premiers essais de fonte, en vue d'obtenir un fromage de longue conservation ont eu lieu en Allemagne en 1890 à partir de fromages à pâte molle. La technique de fonte a ensuite été perfectionnée pour être applicable aux fromages à pâte pressée et en 1911, la société Gerber commercialisa en Suisse le premier fromage fondu à base d'emmental. Les dernières années de la 1^{ère} grande Guerre marquent le début de l'industrialisation des fromages fondus et la première usine européenne fut montée à Dôle en 1917 (Richonnet, 2016).

I.1.2. Définitions normatives et réglementaires

Sur le plan réglementaire la dénomination "fromage fondu" est réservée au produit obtenu par la fonte et l'émulsification, à l'aide de la chaleur (à une température d'au moins 70°C pendant 30 secondes ou toute autre combinaison équivalente), de fromage ou d'un mélange de fromages, additionné éventuellement d'autres produits laitiers. Le fromage fondu présente une teneur minimale en matière sèche de 40 % de produit fini. Par dérogation aux dispositions du premier alinéa, un fromage fondu allégé en matière grasse et dont la dénomination "fromage fondu" est complétée sur l'étiquetage d'une mention faisant état de cet allègement en matière grasse présente une teneur minimale en matière sèche de 30% de produit fini. (Décret n° 2013-1010, JORF N°0264, 2013).

Le fromage fondu est un produit à très longue durée de conservation. Inclut les produits obtenus par fonte et émulsification du mélange de fromages, sous l'action de la chaleur et par utilisation de sels de fonte dans un mélange homogène, pour produire une émulsion homogène, lisse et stable.

Les matières premières utilisées dans la fabrication des fromages fondus se distinguent en trois catégories: Catégorie «a» représente les fromages; Catégorie «b» englobe Produits laitiers riches en matière grasse (par exemple, beurre, huile de beurre,

crème, crème en poudre); Catégorie «c» est représentée par: lait et produits laitiers autres que ceux mentionnés ci-dessus (par exemple, laits concentrés, babeurre, laits en poudre, protéines de lait, poudres de lactosérum, lactose).

Le changement des techniques de transformation et de la composition entraînent des textures différentes allant de filant, tartinable, semi-solide à tranchable.

Les fromages fondus portant un ou des noms de variété sont des fromages fondus, tel que définis précédemment, caractérisés par l'utilisation en cours de fabrication d'une ou de plusieurs variétés de fromage figurant dans leur nom (Codex alimentaire, 2015).

Pour le Centre canadien d'information laitière, le fromage fondu est l'aliment fabriqué par fragmentation et mélange thermique de la (des) variété(s) de fromage et/ou d'ingrédients facultatifs et d'additifs autorisés en une masse homogène. Le fromage fondu doit contenir au moins 51 % d'ingrédients laitiers, dont au moins 50 % sont du fromage.

1. Dans le cas du fromage fondu (nom de la variété), le(s) fromage(s) utilisé(s) doit (vent) répondre aux normes de composition de la (des) variété(s) de fromage dénommée(s). Le fromage fondu (nom de la variété) doit avoir une teneur totale en ingrédients fromagers d'au moins 51 %.
2. Dans toutes les versions de fromage fondu, l'aliment fini doit contenir au plus 60 % d'humidité, sauf dans le cas des fromages fondus allégés (réduits en gras) qui peuvent contenir un maximum de 65 % d'humidité.

Le fromage fondu peut contenir les ingrédients sans danger et acceptables suivants : ingrédients laitiers et ingrédients laitiers modifiés, sel, vinaigre, édulcorants, arômes, assaisonnements, épices, condiments, chocolat, fruits, légumes, cornichons, noix, viande préparée ou en conserve, poisson préparé ou en conserve et additifs alimentaires autorisés.

Le nom de l'aliment doit être fromage fondu. Dans le cas d'ingrédients ajoutés dénommés, il doit être fromage fondu avec (nom des ingrédients ajoutés) (C.C.I.L., 2005).

Les principaux avantages du fromage fondu sont :

- Produit stabilisé par un traitement thermique, ce qui lui confère son aptitude à la conservation et permet sa commercialisation même sous des climats chauds.
- Produit à goût doux et régulier.
- Produit présentant une excellente valeur nutritionnelle du fait de l'origine laitier des matières premières utilisées.

- Produit à larges possibilités de présentation, d'usage et d'aromatization : le produit peut être consommé à tout moment de la journée, à froid comme à chaud, pour le grignotage, le tartinage ou la cuisine (Eck et Gillis, 2006).

I.1.3. Les différents types des fromages fondus

Les produits issus de la fonte de fromages peuvent être regroupés en sept familles classées ici par ordre d'apparition sur le marché mondial :

- **Fromage fondu de type « bloc »**

Le traitement thermique subi est modéré de manière à conserver au produit fini une élasticité marquée et une bonne tranchabilité, comparable à celle d'un fromage classique. L'objectif est de retrouver l'aspect d'un fromage à pâte pressée (Richonnet, 2016).

- **Fromage fondu type « coupe »**

Moins ferme que le bloc, mais non tartinable. Il contient 3 à 4 % de moins de matière sèche que le précédent, ce qui le rend plus agréable à la dégustation. L'élasticité, parfois recherchée, n'est pas toujours souhaitable en raison de la formation de fils qui rendent le conditionnement délicat sur les machines classiques.

- **Fromage fondu tartinable**

C'est le processus de crémage qui permet en partie de régler la consistance du produit fini et de lui conférer une certaine tartinabilité. Ces produits peuvent être aromatisés et conditionnés en emballages souples (portions) ou rigides (pots, barquettes, tubes). Ils existent principalement sous trois formes: La portion aluminium (la plus répandue), la présentation en barquette et, plus marginale, la présentation en tube (Tamime, 2011).

- **Fromage fondu ayant une texture « crème »**

Ils possèdent généralement un ratio caséines sur protéines totales plus faible que les fromages fondus tartinables. Ils conservent une propriété d'écoulement à température ambiante (caractère visqueux) et sont généralement conditionnés en barquettes, pots, tubes (Roustel, 2014).

- **Fromage fondu toastable (pour refonte)**

Originnaire d'Amérique du Nord, il se présente généralement sous forme de tranches adaptées à une utilisation dans les cheese-burgers. Ce produit doit refondre rapidement sans carbonisation superficielle. Ils peuvent être produits à partir de fromages fondus de type «bloc», mais aussi après coulage dans un film plastique,

suivi d'un refroidissement rapide, d'une préparation fromagère fondue dont la texture est obtenue, entre autres, par la gélification d'un hydrocolloïde (carraghénanes en général) (Boutonnier, 2000; Roustel, 2014).

- **Fromage fondu thermostable**

Issu d'une demande extrême-orientale, à l'inverse du précédent, ce fromage fondu ne doit pas fondre lorsqu'on le soumet à une nouvelle source de chaleur. Il subit un crémage très poussé et les blocs obtenus sont découpés puis incorporés dans des plats cuisinés à base de légumes ou de poissons. Ces préparations peuvent être appertisées, et les cubes de fromage fondu doivent rester intacts après la stérilisation (Oliveira *et al.*, 2016; Richonnet, 2016).

- **Fromages frais fondus**

Ces fromages fondus sont obtenus à partir de fromages non affinés. De ce fait, ils présentent des caractéristiques sensorielles très différentes des autres produits. De texture courte et tartinable, ils sont généralement de couleur blanche et ont des saveurs plus lactiques (Roustel, 2014).

I.1.4. Caractéristiques des fromages fondus

I.1.4.1. Caractéristiques physico-chimiques et biochimiques

Le fromage fondu est un système complexe composé de protéines, de matière grasse, de sels minéraux et d'autres ingrédients (Dantas Cavalcante, 1995) (Tableau 1). Ses principales caractéristiques sont :

- **pH**

Le pH du fromage fondus varie entre 5,3 à 5,8 selon Eck et Gillis (1997), 5,4 et 5,8 selon Roustel (2014) et 5,50 à 5,55 d'après Roustel et Boutonnier (2015). Le pH final a des effets significatifs sur la qualité, la microstructure et le type d'interactions entre les protéines dans le fromage fondu (Marchesseau *et al.*, 1995).

Le pH agit à plusieurs niveaux. Son effet intervient dès le processus d'échanges d'ions. En effet, l'augmentation du pH provoque un accroissement de la charge négative des protéines et améliore l'action des sels de fonte, ce qui facilite la deuxième phase du processus de fonte: La peptisation. Il est à noter que des petites variations de pH peuvent affecter la structure et la composition du fromage fondu (Roustel, 2014).

Tableau 1: Caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus en portions (Richonnet, 2016).

Composition (Pour 100g de produit)	Fromage fondu à 20 % de G/S	Fromage fondu à 50 % de G/S
Energie (Kcal)	172	264
Energie (Kj)	880	1100
Protéines (g)	13,0	10,2
Glucides (g)	15,7	6,5
Lipides (g)	7,0	22,5
Acides gras saturés (AGS) (g)	/	14
Eau (g)	65,8	54,7
Sodium (mg)	665	737
Phosphore (mg)	695	703
Calcium (mg)	492	576

Les quantités de nutriments indiquées sont des valeurs moyennes, pouvant varier selon le type de fromages fondus.

- **L'extrait sec total et la teneur en eau**

La teneur en matière sèche du fromage fondu varie de 29, 34 et 57% pour les fromages fondus avec une teneur minimale en fromage de 75% pour un rapport G/S allant de G/S < à 30%, G/S \geq 30% et G/S > 50% respectivement. Alors que pour les fromages fondus avec une teneur minimale en fromage de 51%, la teneur minimale en extrait sec est de 29, 34 et 50% avec un rapport du G/S allant de G/S < à 30%, G/S \geq 30% et G/S > 50% respectivement. Tandis que pour les fromages fondus tartinable la teneur en matière sèche est de 25, 30 et 40% avec un rapport du G/S allant de G/S < à 30%, G/S \geq 30% et G/S > 50% respectivement (Codex alimentaire, 2015).

Alors qu'en 2016, Richonnet préconise un taux de 50% de matière sèche dans les fromages fondus.

L'augmentation de la teneur en humidité des fromages facilite le processus d'échange d'ions et conduit à une augmentation du coefficient de peptisation.

De ce fait il a été montré que plus les caséines sont hydratées, plus leur structure est ouverte, ce qui permet aux sels de fonte de pénétrer plus facilement les molécules des caséines et d'améliorer le phénomène de peptisation (Dimitreli et Thomareis, 2005).

- **Protéines**

Le fromage fondu contient 18g de protéines/100g de fromage et entre 10 à 17g /100 g de fromage selon Eck et Gillis (1997) et Richonnet (2016) respectivement.

Les fromages fondus présentent globalement moins de protéines que les autres

fromages: Environ 10 à 17g/100g contre 22 à 27g/100g pour les pâtes molles et pâtes pressées non cuites.

La source des protéines dans les fromages fondus est représentée par les ingrédients laitiers tels que le lait, les fromages et les concentrés protéiques principalement. La qualité nutritionnelle de ces protéines laitières repose sur une forte digestibilité (> 95%) et une composition en acides aminés indispensables particulièrement bien équilibrée permettant de satisfaire les besoins de l'homme (Debry, 2001).

Dans les fromages fondus, les caséines sont les protéines majoritaires (92 % des protéines), caractérisées par une teneur élevée en proline et un taux relativement faible en acides aminés (AA) soufrés (cystéine notamment) (Richonnet, 2016). Il a été constaté, qu'un fromage fondu devait avoir une teneur en caséine intacte de 12% au minimum dans le produit fini. Selon les paramètres de fabrication, il est toutefois possible d'obtenir un produit stable avec seulement 8% de caséines intactes (Roustel, 2014).

▪ **Lipides**

La teneur des fromages fondus en lipides est de l'ordre de 21 à 22g/100g de fromage selon Richonnet (2016) alors que Oliveira *et al.*(2016) rapportent une teneur en lipides $\geq 30\%$.

Les lipides présents dans les fromages fondus sont exclusivement issus des matières grasses laitières apportées par leurs ingrédients: fromages, lait, beurre, crème ou matière grasse laitière. La composition de la matière grasse des fromages fondus est donc en tout point comparable à la matière grasse laitière. Présentée sous forme bien émulsionnée, sa digestibilité est optimale et elle est caractérisée par sa richesse en acides gras saturés (AGS) : 60-65% des acides gras (Legrand, 2008).

Il convient donc de choisir les fromages les moins gras au quotidien. Les fromages fondus, surtout dans leurs versions allégées, peuvent être de bons choix puisqu'ils apportent environ 22 % de matières grasses, ou 15 % dans les versions allégées, contre 26 % pour les pâtes molles (Camembert 20%) et 28% pour les pâtes pressées (Crédoc, 2013).

• **Lactose**

La teneur en lactose dans les fromages fondus est de l'ordre de 6,5 à 7g/100g de fromage fondu. Cette teneur a une influence sur la consistance du produit fini. Le lactose a un effet favorable sur la plastification et la structuration du gel, ce qui

favorise la tartinabilité du fondu. Cependant, son taux d'incorporation ne doit pas être trop élevé pour éviter l'apparition du goût sucré et les réactions de Maillard, voire de cristallisation du lactose (EFSA, 2010).

- **Cendres**

Les sels minéraux du fromage fondu sont constitués des sels de fonte ajoutés au cours de la fabrication et des sels contenus dans le fromage matière première (Varunsatian *et al.* 1983). Les sels de fonte sont des agents importants pour la fabrication de fromages fondus, ils sont d'ailleurs à l'origine de l'industrie de la fonte. Parmi les sels de fonte les plus utilisés en industrie fromagère : Orthophosphate monosodique, Phosphate disodique, Phosphate trisodique, Pyrophosphate disodique, Pyrophosphate tétrasodique, Triphosphate pentasodique, Tétrapolyposphate de sodium et Citrate trisodique (Roustel, 2014).

Le taux maximal de sels de fonte autorisé est de l'ordre de 2 à 3% dans la formule selon le règlement UE n° 1333/2008 et Eck et Gillis (1997) respectivement.

- **Calcium**

Les fromages fondus contiennent en moyenne 562 à 576mg de calcium pour 100g de fromage. Le calcium provient des fromages et du lait mis en œuvre mais aussi parfois de vecteurs d'enrichissement comme les concentrés calciques laitiers ou du phosphate de calcium employés pour enrichir ces fromages en calcium. Chez l'enfant, la consommation de fromages fondus participe donc à la couverture du besoin nutritionnel moyen en calcium et se traduit par un meilleur statut en calcium chez les consommateurs (Weaver *et al.*, 1999).

- **Sodium**

Le chlorure de sodium ou plus généralement le sel a de nombreux effets sur le fromage fondu. Il a un rôle au niveau biochimique, microbiologique et organoleptique. Il intervient également sur le développement des saveurs et également sur la texture des fromages (Guinee *et al.*, 2004).

Le sodium présent dans les fromages fondus a trois origines: Les fromages ingrédients, les sels de fonte sodiques et le chlorure de sodium (sel de cuisine) ajouté lors de la production. Avec une moyenne de 737mg à 1600mg de sodium, les fromages fondus se situent au niveau de certaines pâtes pressées (Richonnet, 2016).

L'ajout de sels de fonte dans les fromages fondus, de type phosphate (polyphosphate de sodium, pyrophosphate de sodium) qui contiennent environ 25% de phosphore induit une élévation des teneurs en phosphore et un rapport Ca/P moins satisfaisant. Il faut donc

préférer les fromages fondus avec un taux de calcium optimal et dont les sels de fonte, surtout ceux de type polyphosphate sont réduits (Takeda *et al.*, 2014).

D'une manière générale le fromage fondu est un produit soumis à de nombreuses transformations. Ses caractéristiques sont par conséquent dépendantes de nombreux facteurs, pouvant interagir entre eux (Voir figure 1).

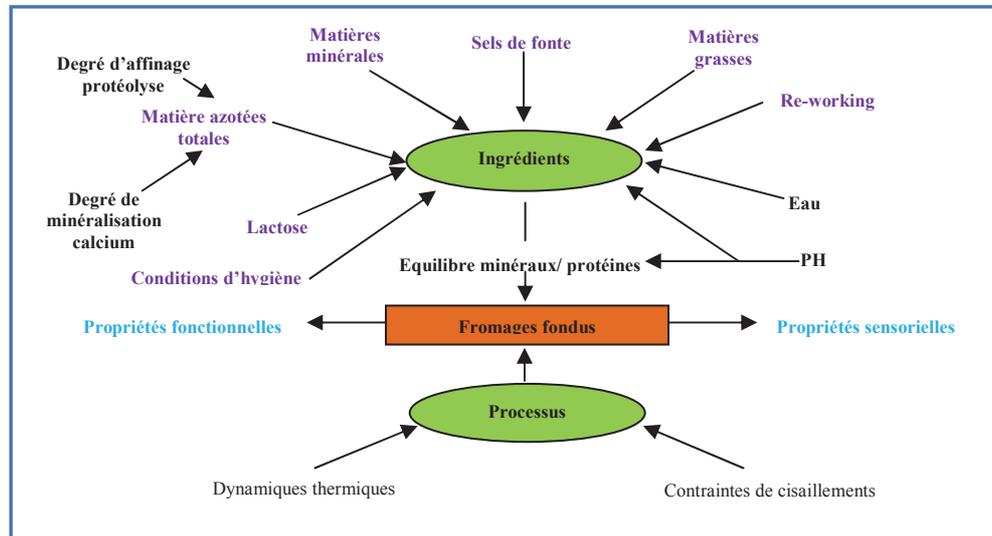


Figure 1: Facteurs intervenant sur les caractéristiques des fromages fondus (Roussel, 2014)

I.1.4.2. Caractéristiques microbiologiques

La qualité microbiologique du fromage fondu dépend principalement de la qualité microbiologique des matières premières utilisées, le pH, la teneur en matière sèche, la teneur en chlorure de sodium, la concentration, le type des sels émulsifiants et de l'intensité du traitement thermique (Glass et Doyle, 2013 in Buňková et Buňka, 2015).

Les conditions d'hygiène lors de la fabrication, les matériaux, le type d'emballage et les conditions de stockage ont aussi un effet. En outre, le procédé de refroidissement de la masse fondue enveloppée chaude a une influence significative sur la texture et sur la charge microbienne (Buňková et Buňka, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Pendant la production du fromage fondu, la température de chauffage appliquée permet la destruction des cellules de formes végétatives dans le mélange de matières premières. Cependant, cette température n'est pas suffisante pour tuer les spores bactériennes. Les valeurs réelles des facteurs internes (principalement $pH > 4,5$; activité de l'eau $a_w > 0,85$) permettent également la germination des spores bactériennes (Buňková et Buňka, 2015). Le nombre de microorganismes présents dans le fromage fondu peut varier. Lazárková *et al.* (2010) ont trouvé 10^4 UFC/g de flore totale (FAMT), un nombre similaire

de bactéries aérobies et anaérobies sporulés et environ dix fois moins de levures et de bactéries dans le fromage fondu non stérilisé. La présence de coliformes n'a pas été observée dans le fromage fondu non stérilisé (Lazárková *et al.*, 2011).

Alors que Sadek *et al.* (2015) ont trouvés un taux de FAMT de $5,6 \times 10^2$ pour les fromages fondus en blocs et $4,5 \times 10^2$ UFC/g pour les fromages fondus en portions. Cette étude était dans le but d'identifier les sources potentielles des anciennes bactéries aérobies et anaérobies dans le fromage fondu. Pendant le stockage, le nombre de microorganismes dans les fromages fondus peut augmenter légèrement (Palmas *et al.*, 1999).

Les principaux contaminants de fromage fondu comprennent des microorganismes psychrotrophes ou des micro-organismes capables de se développer dans l'environnement à faible teneur en oxygène. Les contaminants les plus communs de fromage fondu comprennent des bactéries et des spores de micromycètes. Les contaminants secondaires, à savoir les micro-organismes qui pénètrent dans le produit après la production du fromage fondu ne sont pas négligeables (Blackburn, 2006; Lazárková *et al.*, 2010).

Ces spores peuvent être trouvés sur le sol, équipements et ustensiles utilisés pendant la production de fromage fondu (Oliveira *et al.*, 2016).

Le fromage fondu et d'autres produits alimentaires traités thermiquement sont souvent contaminés par les bactéries sporulés. Palmas *et al.* (1999) ont isolé *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *Brevibacillus laterosporus*, *Clostridium sporogenes*, *C. sordellii* et *C. glycolium* du fromage fondu (Glass et Doyle, 2013).

Parmi les sporulés anaérobies, les espèces de *Clostridium* peuvent aussi entraîner des problèmes de qualité et de sécurité dans le fromage fondu. Le lait et le fromage utilisé comme ingrédients pourrait être la principale source de spores clostridiennes présent dans le fromage fondu (Gómez-Torres *et al.*, 2014). Par conséquent, ces bactéries peuvent causer des troubles microbiologiques dans les fromages fondus. Bien que *C. tyrobutyricum* soit le principal microorganisme pertinent, d'autres espèces clostridiales telles que *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* et *C. butyricum* ont été également contribué à ce défaut (Gómez-Torres *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2016).

Les bactéries sporulées ne sont pas le seul groupe impliqué dans les processus indésirables des produits alimentaires. Les bactéries non sporulées provoquent également la détérioration de fromage fondu. Ces micro-organismes comprennent à la fois les bactéries pathogènes et les bactéries non- pathogènes et les micromycètes. Les bactéries à Gram-positif non sporulées qui ont été isolées à partir de fromage fondu incluent les Lactobacilles, Micrococcus, Staphylococcus, Microbacterium et les actinomycètes.

Dans la liste des contaminants potentiels de fromage fondu, les agents pathogènes Gram-positif ne devraient pas être négligés.

Un autre agent pathogène possible de contamination du fromage fondu est *Listeria monocytogenes*. Dans des cas isolés, la présence de *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus* a été observée (Kahraman *et al.*, 2010). *Listeria* appartient aux bactéries présentes en abondance dans l'environnement et est souvent isolée comme contaminant du lait cru, habituellement pendant la saison froide. *L. monocytogenes* peut être présente même dans les laiteries ayant une bonne hygiène. Elle contamine souvent les systèmes de tuyauterie, les surfaces ou l'équipement de réfrigération (Angelidis *et al.*, 2010). Les bactéries à Gram négatif pathogènes qui peuvent secondairement contaminer le fromage fondu comprennent, par exemple *Salmonella* et *Escherichia coli* O157: H7 ou d'autres représentants de la famille des entérobactéries. D'autres contaminants possibles de fromage fondu peuvent être les bactéries provoquant sa détérioration. Des exemples de telles bactéries comprennent des bactéries psychrotrophes à Gram négatif de *Pseudomonas fluorescens* et *Aeromonas hydrophila* isolées à partir de fromage fondu italien (Glass *et Doyle* 2013; Buňková *et Buňka*, 2015). Outre les bactéries, le fromage fondu peut également contenir des levures, des micromycètes. Ces microorganismes peuvent provoquer différents défauts de fromages fondus (Daly *et al.*, 2012).

La détérioration de la qualité du fromage fondu est causée principalement par les représentants du genre *Penicillium* (*P. commune*, *P. roqueforti* etc.). Les levures : *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Candida parapsilosis*, *Kluyveromyces marxianus* et les micromycètes : *Penicillium chrysogenum*, *P. frequentans*, *P. notatum* et *P. sidowii* ont été isolés à partir du fromage fondu fabriqué en Italie (Palmas *et al.*, 1999). A partir de fromage fondu fait en Egypte, *Aspergillus flavus*, *A. niger* et *Penicillium viridicatum* ont été isolé (Buňková *et Buňka*, 2015). Dans d'autres fromages, utilisés pour la production de fromage fondu ont été détectés diverses mycotoxines, sterigmatocystine, aflatoxine M1, l'ochratoxine A ou patuline (Oliveira *et al.*, 2011; Pattono *et al.*, 2013).

I.1.5. Fabrication des fromages fondus

La fonte des fromages consiste à un mélange et a une stabilisation qui comporte plusieurs voies, selon le type de fromage fondu fabriqué, le type de matériel utilisé et la sévérité du traitement thermique visé. En outre, le volume de production réalisé induira un processus continu ou discontinu (Chambre *et Daurelles in Eck et Gillis*, 1997) (Voir figure 2).

I.1.5.1. Préparation des matières premières

Cette étape consiste au nettoyage des fromages éventuellement souillés en surface ou pour lesquels la croûte est considérée comme indésirable. En effet, dans certains cas, la dureté de celle-ci peut entraîner des difficultés de fonte et la présence dans le produit fini de particules infondues. Cet écroûtage peut se faire par raclage, par abrasion ou encore par jets d'eau ou de vapeur sous pression (Boutonnier, 2000; Richonnet, 2016).

I.1.5.2. Mélange, cuisson et fonte

Le plus souvent, le mélange est effectué dans plusieurs pré-mélangeurs fonctionnant de manière décalée afin d'assurer un fonctionnement continu de la ligne de fabrication. L'homogénéité du mélange est fondamentale pour assurer une bonne qualité du produit fini ; elle est notamment fonction du matériel, de l'intensité des forces de cisaillement générées par les systèmes d'agitation, ainsi que de la durée du traitement. Deux paramètres sont fondamentaux : la température et le temps de fonte (Roustel et Boutonnier, 2015).

I.1.5.3. Stabilisation thermique de la pâte

Deux possibilités s'offrent aux industriels : une pasteurisation, ou une stérilisation. Le choix s'effectue en fonction de la qualité bactériologique des fromages mis en œuvre, du matériel à disposition et du type de produit fini. En pratique, les températures rencontrées s'échelonnent de 70°C pour des produits finis à pouvoir de refonte élevé, jusqu'à 140°C, voire 145°C, pour des fromages fondus tartinables (Oliveira *et al.*, 2016).

I.1.5.4. Crémage

Pour les fromages fondus tartinables, et ce d'autant plus que le mélange est sévèrement chauffé, on doit contrôler la gélification des protéines, c'est-à-dire leur restructuration partielle en réseau tridimensionnel. Cette opération peut se réaliser directement dans le pétrin ou le cutter pour les petits volumes. Pour les productions continues, le crémage est effectué dans une cuve, avec un système d'agitation servant de tampon entre le traitement thermique du fromage fondu et son conditionnement. Cette étape a pour but d'ajustement de la consistance (Boutonnier, 2000).

I.1.5.5. Conditionnement du fromage fondu

Le conditionnement du fromage fondu doit faire l'objet d'une attention particulière pour plusieurs raisons: Présentation extérieure du produit ; assurance d'une fermeture étanche garantissant au fromage fondu le statut de semi-conserve. Le conditionnement est généralement réalisé de manière entièrement automatique, à des cadences relativement rapides, le tout avec une grande sécurité hygiénique (Oliveira *et al.*, 2016).

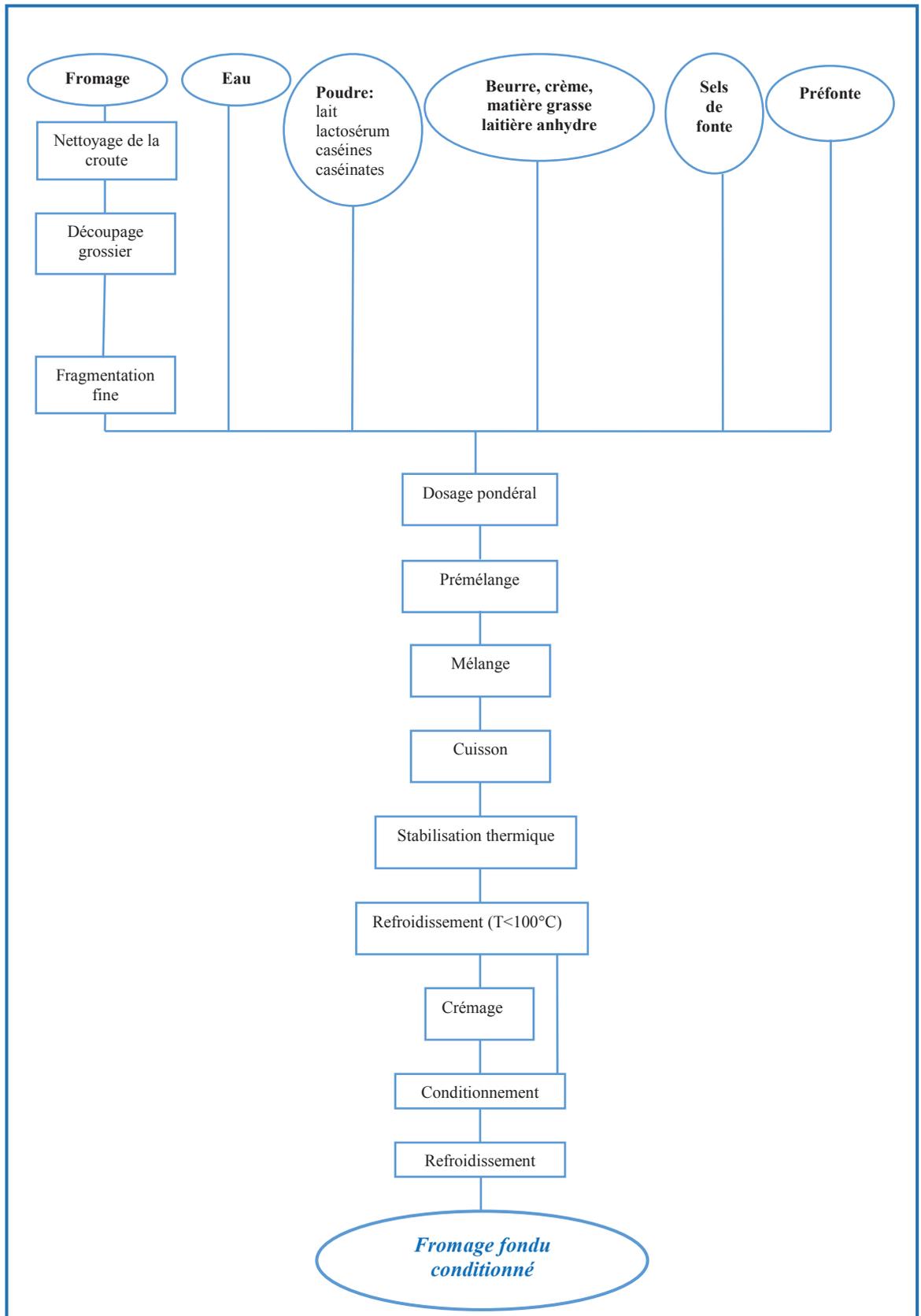


Figure 2: Diagramme de fabrication du fromage fondu (Boutonnier, 2000)

Parmi les différents types de conditionnement du fromage fondu, c'est le conditionnement en portions à tartiner qui est le plus populaire. Celui-ci s'effectue dans une feuille d'aluminium vernie sur les deux faces. La feuille est préformée par pression sur la machine sous forme d'une coquille qui, après remplissage avec la pâte fondue, reçoit un couvercle avant l'accomplissement du scellage. Le scellage a lieu entre 60 et 75°C, ce qui permet d'utiliser dans certains cas la seule chaleur du fromage fondu comme énergie de scellage (Roustel et Boutonnier, 2015).

I.1.5.6. Refroidissement du produit fini

Le mode de refroidissement du fromage fondu varie selon le format et le type du produit. Dans la majorité des cas, le fromage fondu conditionné à chaud doit être refroidi rapidement afin d'éviter les risques de brunissement non enzymatique de la pâte (réaction de Maillard). Cette vitesse de refroidissement varie avec la taille du produit et son système d'emballage. Ce refroidissement peut se faire par circulation des produits sur des tapis à l'air ambiant, mais les meilleurs résultats sont obtenus dans des tunnels de refroidissement (Boutonnier, 2000).

I.1.5.7. Stockage du produit

Les produits finis mis en carton sont stockés dans des entrepôts dont la température se situe autour de 10 à 15°C et la durée de conservation peut être estimée entre 6 à 12 mois si les conditions optimales au cours de différentes étapes de fabrication sont bien respectées. A des températures de stockage comprises entre 30 et 35°C, une contamination par les moisissures, les levures et *Clostridium botulinum* pourra survenir ce qui peut mener à une sécrétion des toxines (Eckner *et al.*, 1994; Eck et Gillis, 1997).

I.1.6. Défauts de fabrication de fromage fondu

La qualité d'un fromage fondu est influencée par de nombreux facteurs liés à la formulation et au procédé de fabrication. C'est ainsi que de très légers écarts dans la mise en œuvre peuvent avoir des conséquences significatives. Celles-ci peuvent se traduire par la survenue de défauts observables dès le stade de fonte ou après un certain temps de stockage (Roustel et Boutonnier, 2015).

Ces défauts peuvent être décelés lors de la fabrication ou bien après conditionnement et ils ont pour origine des facteurs chimiques, physiques ou microbiologiques.

I.1.6.1. Défauts d'origine chimique ou physique

Plusieurs défauts peuvent être décelés avant les opérations du conditionnement, parmi les quels : La pâte présente un aspect grumeleux, la pâte reste liquide; La pâte

destinée au fromage fondu à tartiner fait des fils; Le produit présente un défaut de coloration brun clair à brun foncé; La séparation des phases s'accompagne d'exsudation de matière grasse, due à une mauvaise émulsification de la matière grasse. Alors que parmi les principaux défauts, causes et corrections qui surviennent d'origine chimique ou physique après conditionnement sont illustrés dans le **tableau 2**.

I.1.6.2. Défauts d'origine microbiologique

Parmi les défauts les plus répandus d'origine microbienne: Présence d'ouvertures (trous dans la pâte du fromage fondu) du au développement bactérien (*Clostridium*, coliformes...), changements physiques (présence de l'air, CO₂ produit par le mélange du citrate) et changements chimiques (hydrogène résultant de la réaction entre le fromage fondu et le papier aluminium). Le remède dans ce cas est de bien choisir les ingrédients du mélange, conserver la température de fonte >95°C, utiliser un système de cuisson et de conditionnement sous vide, augmenter le temps de fonte, tester la porosité du papier aluminium (Fox *et al.*, 2017a).

Le gonflement du fromage fondu est un accident de fabrication particulièrement grave qui se traduit par la présence de nombreux yeux dans le fromage, principalement près de la surface. Les germes responsables sont divers. Assez rarement il s'agit de bactéries coliformes ou levures, gênées par l'absence de lactose. Plus souvent, ce sont des sporulés anaérobies qui interviennent parmi lesquels *Clostridium butyricum*, capable de se développer à partir des lactates. Toutefois, la cause de gonflement la plus fréquente reste encore la présence massive de bactéries propioniques. Pour lutter contre le gonflement butyrique, l'addition aux fromages, au moment de la fonte, d'une culture sur lait de streptocoques producteurs de nisine, mélange de polypeptides thermostables inhibant le développement des ferments butyriques (Gouet et Bergere, 1973; Veisseyre, 1979).

Le fromage fondu peut être aussi recontaminé au moment du conditionnement (Coliformes, levures, moisissures) ou après conditionnement, par suite d'un défaut dans l'étanchéité de l'emballage (Beernens et Luquet, 1987). Il y a d'autres défauts également tels les défauts fonctionnels qui peuvent être définis comme l'incapacité des fromages à présenter les propriétés d'usages pour lesquels ils ont été fabriqués. Ces défauts englobent leurs propriétés lors de leur découpe, fragmentation (fermeté, collant, rapabilité, texture friable et/ou cassante, etc.), leur comportement à la fonte (étalement, filant, coloration, exsudation de matière grasse...), et leur durée de conservation (Roustel et Boutonnier, 2015).

Tableau 2 : Principaux défauts d'origine physico-chimique des fromages fondus (Caric et Kaláb, 1993).

Défauts	Causes	Corrections
Texture molle	Humidité élevée, quantité de sels insuffisante, agitation lente, fonte prolongée, pH élevé, refroidissement rapide, excès de fromages affinés dans le mélange	Réduire la teneur en eau, utiliser un autre sel de fonte, augmenter le pH, ralentir le refroidissement, augmenter la teneur en fromages jeunes, réduire le temps de fonte, augmenter la vitesse d'agitation
Texture dure	Humidité basse, sels de fonte non adaptés (dose, nature), faible pH, refroidissement long, mélange adapté, excès de fromages ayant une forte aptitude au crémage	Augmenter la teneur en eau, ajuster les sels de fonte, augmenter le pH, augmenter la vitesse de refroidissement, changer la formulation des fromages, éviter l'ajout de préfonte trop crémée
Texture gluante (fromage tartinable)	Excès de fromages jeunes, sels de fonte non adaptés, absence de la préfonte dans le mélange, fonte rapide et agitation lente	Augmenter la proportion de fromages affinés, utiliser un sel de fonte adapté, ajouter de la préfonte, augmenter le temps de la fonte, augmenter la vitesse de l'agitation
Texture ferme avec exsudation de l'eau pendant le stockage	Effet de surcrémage, développements microbiens conduisant à la baisse du pH	Éliminer tous les facteurs qui causent un crémage excessif, bien choisir les ingrédients, conserver une température de fonte supérieure à 85°C.
Texture granuleuse (non homogène)	Processus de fonte et mélange insuffisants, sels de fonte en excès ou insuffisants, pH bas, temps de fonte réduit, température de fonte basse, quantité d'eau ajoutée insuffisante, agitation inadéquate	Ajouter des fromages jeunes, utiliser le sel de fonte adapté et en quantité suffisante, régler le pH, prolonger le temps de fonte en vue d'obtenir une masse homogène, augmenter la température de fonte au-delà de 85°C, augmenter la teneur en eau ajoutée, agiter en continu durant la fonte et le remplissage
Texture friable, cassante	Apparition fréquente lorsque le pH final du fromage fondu est très faible (<5,3). Les caséines sont alors proches de leur point isoélectrique, ce qui augmente la contraction du réseau protéique et les interactions protéines-protéines dont la résultante peut être l'apparition d'une texture friable et cassante	Ajuster le pH du produit fini par l'emploi de sels de fonte correcteurs de pH et/ou d'une formulation plus adaptée des fromages
Produit collant (adhérent au papier d'emballage)	Emballage métallique collant, pH trop élevé, masse fondue laissée chaude pendant un long moment sans agitation	Changer l'emballage, augmenter la proportion des fromages affinés ou améliorer le crémage, conserver le pH<6 et une agitation continue jusqu'à l'opération d'emballage
Présence de marbrures	Origine pouvant être mécanique (mélange de pâtes issues de plusieurs machines, malaxage insuffisant avant dosage), ou physico-chimique (utilisation de citrates)	Améliorer la qualité du mélange avant dosage, supprimer ou réduire l'emploi de citrates

PARTIE I: Partie bibliographique

Présence de cristaux	Cristaux de di- et de mono-phosphate de calcium (quand ces anions sont utilisés dans le sel de fonte), cristaux de calcium (quand le citrate est utilisé comme sel de fonte), usage de préfonte sableuse, sels de fonte insolubles, formation de cristaux de lactose, précipitations des grains de tyrosine (fromages à pâte pressée cuite trop affinés)	Éviter l'usage du mono ou di-phosphate comme sel de fonte, réduire le citrate, éliminer la préfonte sableuse, augmenter le temps de fonte, ajouter le sel de fonte en solution (si nécessaire), utiliser une dose précise de sels de fonte, réduire les apports de lactose (poudre de lactosérum par exemple), éliminer les fromages contenant des cristaux de tyrosine
Produit rance	Fromages trop affinés, beurre ou matière grasse de mauvaise qualité	Corriger la composition du mélange (ajout des fromages jeunes), changer de corps gras
Produit amer	Fromages amers dans le mélange, quantité de calcium à l'état ionisé trop importante	Ajouter des fromages affinés (avec un pH élevé), d'après un sel de fonte correcteur de pH et plus séquestrant
Produit trop salé	Fromages salés, excès du sel de fonte	Ajouter des fromages jeunes et non salés, diminuer la quantité du sel de fonte
Produit sucré	Fromages initiaux avec ouvertures (propioniques), teneur en lactose excessive	Corriger la formulation du fromage fondu
Produit sucré-salé	Concentration élevée en lactose et sels minéraux (utilisation de poudre de lactosérum en excès)	Réduire la quantité de produits de lactosérum dans le mélange
Particules brûlées	Surchauffage par vapeur indirecte avec la présence du lactose (dégradation thermique du lactose)	Réduire la température du traitement thermique lors des chauffages indirects
Brunissement	Réaction de Maillard (lactose et acides aminés), usuellement lors de l'utilisation des fromages très jeunes ou des produits de lactosérum.	Choisir une température de fonte <90°C, refroidir les fromages fondus directement après emballage, éviter un pH élevé dans le produit, revoir la formulation
Apparition d'une coloration rose	Apparition principalement dans les fromages fondus colorés avec de l'annatto ou élaborés à partir de fromages contenant de l'annatto	Supprimer ou réduire l'emploi d'annatto

En conclusion, nous pouvons dire que le fromage fondu présente une importante valeur nutritionnelle et une diversité et flexibilité d'utilisation, cependant il peut être exposé à la contamination de bactéries pathogènes et d'altération à l'exemple de *Bacillus cereus*, L'objet de notre étude consiste en cela.

I. Partie bibliographique : Chapitre 2

I.2. *Bacillus cereus*

Coliformes, levures et moisissures et parfois des sporulées anaérobies (Veisseyre, 1979) et des sporulés aérobie tel que *Bacillus cereus* qui fait globalement partie de la flore d'altération des produits laitiers (Gaillard, 2003) et qui peut négativement affecter la qualité et la sécurité du produit (Senesi et Ghelardi, 2010). En fait, *B. cereus* est une bactérie inévitable dans les produits laitiers (Lücking *et al.*, 2013). *Bacillus cereus* sensu stricto est pathogène. Il est bien connu pour son potentiel toxigène avec sa capacité de production de deux types de syndromes d'intoxication alimentaire, un type émétique par la production de la céréulide (Senesi et Ghelardi, 2010) et un type diarrhéique par la production de plusieurs enterotoxines: la Nhe (entérotoxine non hémolytique), Hbl (Hémolysine BL) et Cyt K (cytotoxine K) (Samapundo *et al.*, 2011; Jeßberger, 2014). *Bacillus cereus* est toxigène à des concentrations de 10^4 à 10^5 spores/g du produit (Salustiano *et al.*, 2009).

I.2.1. Description et taxonomie

Bacillus cereus doit sa nomenclature à Frankland et Frankland (1887), dû à sa morphologie: *cereus* (lat) cierge (Ouhib Jacobs, 2007). Le groupe *B. cereus*, également connu sous le nom *B. cereus* sensu lato (*s.l.*), se compose de sept espèces étroitement liées, à savoir *B. cereus sensu stricto* (*s.s.*), *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus weihenstephanensis* et *Bacillus cytotoxicus*. Comme il existe une relation génétique étroite entre les sept espèces du groupe *B. cereus*, il a été suggéré que l'ensemble du groupe devrait représenter une seule espèce (Guinebretière *et al.*, 2013 in Kumari et Sarkar, 2016) (Figure 3).

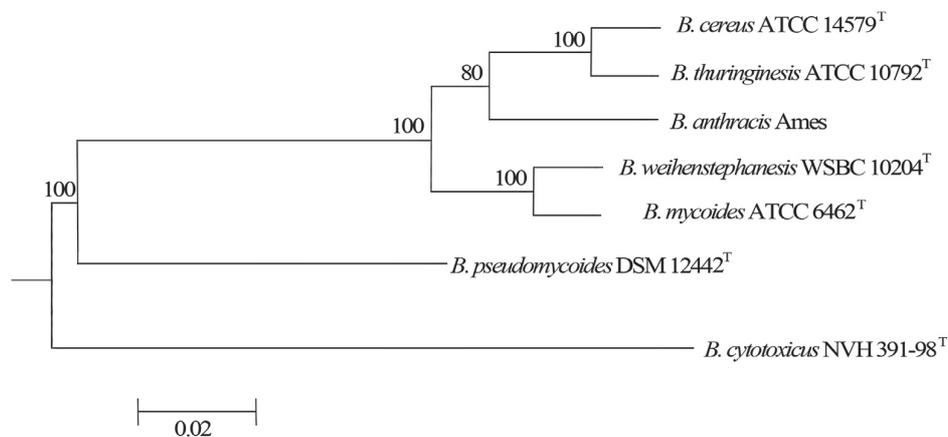


Figure 3: La position phylogénétique des espèces du groupe *Bacillus cereus*, sur la base des séquences (Guinebretière *et al.*, 2013).

Sur la base de données moléculaires et la température de croissance, le groupe *B. cereus* a été divisé en sept groupes phylogénétiques (**Voir tableau 3**). Chacun se divisant en sous-groupes (Guinebretière *et al.*, 2008, Tourasse, *et al.*, 2011).

Le groupe phylogénétique I inclut les espèces *B. pseudomycoïdes* et *B. mycoïdes*. Ces espèces ont la capacité de formation de colonies rhizoïdes (Nakamura, 1998).

Les groupes II, III, IV, V et VI regroupent les espèces suivantes: *B. mycoïdes*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. cereus sensu stricto* aussi appelé *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Ces espèces se caractérisent par les caractéristiques suivantes:

- *B. anthracis*, responsable de la maladie du charbon (Mock et Fouet, 2001). Les souches de ce groupe sont regroupées dans le groupe III.
- *B. weihenstephanensis* est une espèce psychrotolérante pouvant se développer à des températures de réfrigération comprises entre 4°C et 7°C (Lechner, *et al.*, 1998).
- *B. cereus sensu stricto* (*B. cereus*), reconnu comme agent causal de toxi- infections alimentaires (TIA) mais aussi responsable dans une moindre mesure d'infections opportunistes locales et systémiques (Bottone, 2010; Logan, 2012).
- *B. thuringiensis* élabore un cristal parasporal contenant des toxines pathogènes pour les insectes (Schnepf *et al.*, 1998).

Le groupe VII inclut une seule espèce *B. cytotoxicus* qui se caractérise par une thermotolérance modérée (Guinebretière *et al.*, 2008 et 2013).

I.2.2. Caractéristiques générales

Outre les caractères généraux du genre *Bacillus*, les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont des bacilles de grande taille (>1,0 µm) à Gram positif, à spore ovale non déformante et en position centrale à sub-terminale, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche. Ils se distinguent des autres *Bacillus* essentiellement par leur aptitude à croître en anaérobiose et à croître en présence de lysozyme (Kotiranta *et al.*, 2000; Guinebretière, 2001).

Tableau 3: Diversité génétique et écologique de *B. cereus* (Guinebretière, *et al.*, 2008 ; Laouami, 2012).

Groupe phylogénétique	Sous groupes	Gamme de T°C de croissance	% de souches comprenant :							
			<i>hbl</i>	<i>cytK2</i>	<i>cytK1</i>	<i>nhe</i>	<i>ces</i>			
I	<i>B. pseudomycooides</i>	I-1	10-43	41	0	0	100	0		
		I-2		71	0					
II	<i>B. cereus</i> II, <i>B. thuringiensis</i> II	II	7-40	61	13	0	100	0		
		III	<i>B. cereus</i> III, <i>B. thuringiensis</i> III, <i>emetic B. cereus</i>	III-1	15-45	67	73			0
III-2	12			31				31		
III-3	14			57		0	100	7		
IV	<i>B. anthracis</i> , <i>B. cereus</i> III-4, <i>B. thuringiensis</i> III-4	III-4		14	39			0		
		IV	<i>B. cereus</i> IV, <i>B. thuringiensis</i> IV	IV-1		97	79			
				IV-2	10-45	97	97	0	100	0
IV-3	86			79						
V	<i>B. cereus</i> V, <i>B. thuringiensis</i> V	V	8-40	88	6	0	100	0		
VI	<i>B. weihenstephanensis</i> <i>B. mycooides</i> , <i>B. thuringiensis</i> VI	VI-1	5-37	83	0		100			
		VI-2		60	0	0	100	0		
VII	<i>B. cytotoxicus</i> sp. nov.	VII	20-50	0	0	100	100	0		

La mobilité et l'hémolyse sont des caractères couramment utilisés pour distinguer *B. cereus* des autres espèces. Les espèces du groupe *cereus* sont très répandues dans la nature et sont souvent isolées du sol, de la poussière ou de la surface de végétaux, ce qui favorise leur propagation dans les aliments. Certaines espèces sont aussi capables d'infecter des mammifères et/ou des insectes (Drobniewski, 1993).

La gamme de température de croissance de souches du groupe *B. cereus* a été étudiée par plusieurs auteurs. Ils ont constaté que cette gamme est liée aux sept groupes

phylogénétiques. Ainsi elle varie en fonction des souches (Guinebretière *et al.* 2008). Ses température optimale de croissance est comprise entre 28 et 35°C, la température de croissance minimale est 4-5°C et un maximum de 48°C. *B. cereus* peut croître à des valeurs de pH de 4,9 à 9,3. L'activité de l'eau minimum (a_w) pour la croissance est de 0,93 (Jääskeläinen, 2008; Senesi et Ghelardi, 2010; Bermúdez-Aguirre *et al.*, 2012).

Outre sa capacité à produire des spores, *B. cereus* est aussi reconnu comme difficile à éradiquer à cause de la formation de biofilm. Les cellules et les spores végétatives adhérentes peuvent agir comme une étape d'initiation pour la formation de biofilm qui peut être une source de contamination évidente qui va réduire par conséquent la durée de vie du produit (Ryu et Beuchat, 2005)

En effet, *B. cereus* produit une variété de biofilms qui se distinguent par leur architecture et mécanisme de formation, reflétant peut-être une adaptation à divers environnements (Majed *et al.*, 2016).

1.2.3. Ecologie et habitat

Le réservoir naturel de *B. cereus* est représenté par la matière organique en décomposition, les eaux douces et marines, les légumes, flores intestinale des différents animaux, le sol et les produits alimentaires, y compris le lait et les produits laitiers qui peuvent être contaminés, conduisant à une colonisation transitoire de l'intestin humain (Andersson *et al.*, 1995; Yared; 2014).

En raison de la nature adhésive de ses endospores, *B. cereus* est fréquemment présent dans les environnements de production alimentaire. Ce caractère permet à la bactérie de se propager à différents types d'aliments, comme le lait et les produits laitiers, les légumes, le riz et les plats de riz, de la viande et des produits à base de viande, des soupes et des épices (Lukanji, 2015; Organji *et al.*, 2015) (**Voir figure 4, tableau 4**).

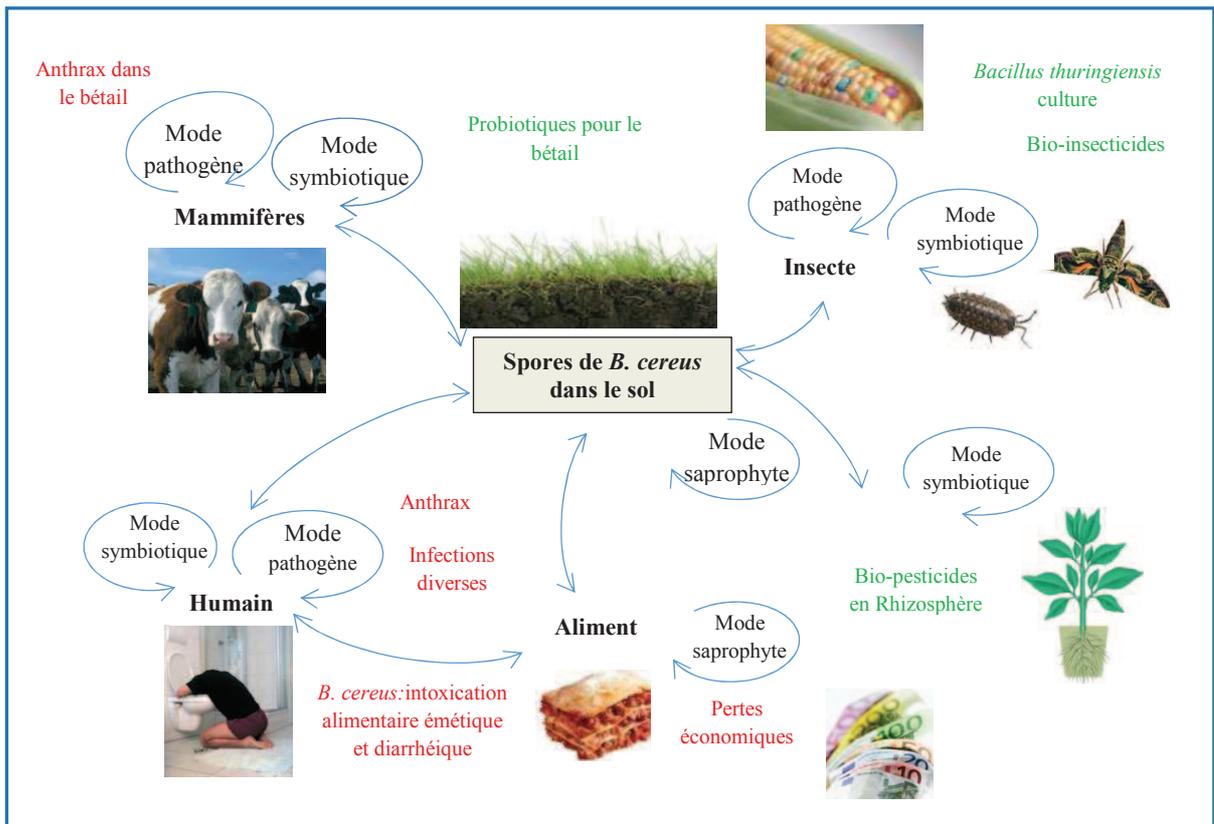


Figure 4: Les différents cycles de vie dans différents hôtes des souches de *Bacillus cereus* (Ceuppens *et al.*, 2013).

Tableau 4: Présence de *Bacillus cereus* dans quelques denrées alimentaires ^a (Te Giffel 1997; Carlin et Nguyen-The ,1998; Guinebretière, 2001).

Aliments	% échantillons positifs	Taux (ufc/g, ufc/ml)
<i>Riz et aliments dérivés</i>		
Riz cru	40 - 100	10 ² - 10 ³
Riz bouilli	10 - 93	10 ¹ - 10 ⁷
Riz frit	12 - 86	10 ¹ - 10 ⁵
Plats cuisinés orientaux	3 - 56	10 ¹ - 10 ⁶
<i>Viande et produits dérivés</i>		
Viande crue	2 - 34	10 ¹ - 10 ³
Viande cuite	22	10 ¹ - 10 ³
Saucisses	4 - 12	10 ¹ - 10 ³
<i>Lait et produits dérivés</i>		
Lait cru	7 - 48	10 ¹ - 10 ²
Lait pasteurize	2 - 40	10 ¹ - 10 ³
Lait sterilize	40	nd ^b
Lait UHT	48	nd
Crème	5 - 11	10 ¹ - 10 ⁵
Fromages	2 - 40	10 ¹ - 10 ³
Poudres de lait	10 - 100	10 ¹ - 10 ⁴
Aliments pour bébé	2 - 100	10 ¹ - 10 ⁴
Crèmes glacées	40 - 52	10 ¹ - 10 ⁴
<i>Produits déshydratés</i>		
Herbes et épices	10 - 75	10 ¹ - 10 ⁶
Céréales, farines, légumes secs	22 - 62	10 ² - 10 ⁵
Pomme de terres déshydratées	40	10 ² - 10 ⁴
Soupes déshydratées	4 - 50	10 ² - 10 ⁴
<i>Produits d'origine végétale</i>		
Légumes	0 - 100	10 ¹ - 10 ⁴
Graines	57	13% > 10 ²
Graines germées	> 63	11% > 10 ⁶
<i>Divers</i>		
Pâtisseries	6 - 41	10 ¹ - 10 ⁴
Poisson	4 - 9	10 ¹ - 10 ⁴
Aliments prêts à consommer	83	nd

^a Valeurs extrêmes déterminées à partir de différentes études, prenant en compte un nombre d'échantillons moyen, allant de 38 (Céréales) à 334 (lait pasteurisé).

^b nd, non déterminé

I.2.4. La spore de *Bacillus cereus*

La spore bactérienne possède une structure propre qui diffère très fortement de celle de la cellule végétative qui lui donne naissance, elle est formée à l'intérieur de cette cellule d'où son nom d'endospore (Gaillard, 2003).

Les endospores de *B. cereus* sont de grande préoccupation pour l'industrie alimentaire, car ils sont omniprésents dans l'environnement (De Vries *et al.*, 2006) et possèdent une résistance remarquable, ce qui leur permet de survivre.

En général, les traitements thermiques, comme la pasteurisation ne parviennent pas à tuer efficacement les endospores résistantes à la chaleur, ce qui limite les possibilités de prolonger la durée de vie des produits pasteurisés. La résistance à la chaleur des spores de *B. cereus* est dépendante de la souche et de milieu de sporulation (Shaheen *et al.*, 2010). La chaleur, les produits chimiques et la diminution du pH peuvent activer les spores (Ghosh et Setlow, 2009).

En raison de l'utilisation extensive de la chaleur comme une technologie de préservation, la chaleur est le mécanisme le plus probable de l'activation des spores dans l'industrie laitière. Après l'activation, la germination des spores de *Bacillus* peut être déclenchée par une interaction d'éléments nutritifs spécifiques (Van der Voort *et al.*, 2010).

I.2.4.1. Thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*

Les spores sont thermorésistants et sont donc d'une grande importance pour l'industrie alimentaire; en particulier le secteur de conserverie. La résistance à la chaleur des spores a été attribuée à son architecture unique et sa composition. En particulier, la déshydratation relative du noyau de spores en raison de sa haute teneur et de l'acide dipicolinique (DPA) (~ 10% des spores poids sec) a été identifié comme étant le facteur le plus important de résistance à la chaleur (Moir *et al.*, 2002; Margosch *et al.*, 2004).

La thermorésistance de la spore bactérienne est influencée par divers facteurs environnementaux qui peuvent exercer leur influence avant, pendant et après le traitement thermique proprement dit (Scheldeman *et al.*, 2004).

Avant le traitement thermique, la thermorésistance peut être affectée par les conditions de sporulation et de l'état physiologique général. En outre, González *al.* (1999) ont constaté que de grandes différences de thermorésistance peuvent aussi se

produire entre les spores de la même espèce. Des différences ont également été signalés entre les souches de *B. cereus* responsable du syndrome émétique d'une part et les souches responsable du syndrome diarrhéiques d'une autre part (Carlin *et al.*, 2006). Les spores de souches productrices de toxines émétiques ont montré, en moyenne, une plus grande résistance à la chaleur à 90 °C que les spores des autres souches. Toutes les conditions de préchauffage, en particulier la température à laquelle la sporulation a eu lieu influencent fortement la résistance à la chaleur des spores résultantes (Scheldeman *et al.*, 2004). Autrement dit, que plus la température de sporulation est élevée plus la thermorésistance est importante (González *et al.*, 1999 ; Rajkovic *et al.*, 2008). La composition du milieu de sporulation est également un facteur qui joue un rôle important sur la résistance à la chaleur des spores. L'augmentation de la résistance à la chaleur observée en corrélation avec une diminution de la teneur en eau des protoplastes de spores.

Pendant le chauffage, l'utilisation supplémentaire des pressions élevées (600 - 800 MPa) a été observée pour aboutir à un niveau élevé de l'inactivation de plusieurs espèces de Bacillus, y compris *B. cereus* (Margosch *al.*, 2004; Scurrah *et al.*, 2006). La nature du moyen ou de la nourriture dans laquelle le chauffage est exécuté aussi bien que les conditions de récupération après le chauffage auront tous un effet sur la résistance à la chaleur observée (Scheldeman *et al.*, 2004).

Après le chauffage, le milieu de récupération de spores traitées thermiquement a une influence sur la valeur de D observé et par conséquent sur la thermorésistance.

I.2.4.2. Germination des spores de *B. cereus*

La dormance d'une spore est normalement interrompue par une phase irréversible, la germination, qui se produit lorsque des conditions favorables et des facteurs de croissance des cellules végétatives se produisent ou lorsque les spores sont exposées à des germinants. Les spores sont capables de contrôler leur environnement au moyen d'un mécanisme d'alerte sensorielles, qui peut détecter le moment où la germination est favorable et où des conditions de croissance se produisent (Moir *al.*, 2002 ; Hornstra *al.*, 2005).

Bien que la germination des spores se produit en réponse à de faibles concentrations de germinants chimiques nutritifs et non nutritifs il est très probable que les spores dans la nature vont finir germer par les germinants nutritifs qui ont

été identifiés à ce jour comprennent les acides aminés simples, les sucres, les nucléosides et les petites molécules (Setlow, 2003; Scheldeman *et al.*, 2004).

En conclusion, une multitude de facteurs jouent un rôle très important dans l'interaction souvent la résistance à la chaleur des spores de *B. cereus*, et ceux-ci peuvent exercer leur influence avant, pendant et après un traitement thermique.

La thermorésistance varie d'une espèce à une autre voir d'une souche à une autre. Les conditions pendant la sporulation (activité de l'eau, le pH ou la température), moyens de chauffage et moyens de récupération, contribuent significativement à la variabilité de résistance à la chaleur observée (Rajkovic *et al.*, 2008).

1.2.5. Pathogénéicité de *Bacillus cereus*

B. cereus tire son pouvoir pathogène de sa capacité à sécréter des toxines. Le pouvoir pathogène de *B. cereus* est attribué à la production de facteurs extracellulaires des espèces telles que la phospholipase, cereulide (toxine émétique), entérotoxine Hbl, toxine non hémolytiques (Nhe), hémolysine (Agata *et al.*, 1995 ; Lund *et al.*, 2000 dans Berthold-Pluta *et al.*, 2015)

B. cereus peut entraîner deux types d'intoxication alimentaire: l'émétique ou les types diarrhéiques. Alors que le syndrome émétique a pour agent étiologique une toxine unique, le syndrome diarrhéique est probablement causé par la combinaison et l'action synergique de plusieurs toxines et enzymes de dégradation (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). La première forme est une forme d'intoxication provoquée par l'ingestion d'aliments contenant la toxine dite cereulide, alors que le type diarrhéique d'intoxication alimentaire dépend dans une large mesure de l'ingestion de *B. cereus* suivie par la production de toxines dans le tractus gastro intestinal humain. La dose infectieuse estimée nécessaire pour provoquant le type diarrhéique des gammes d'intoxication alimentaire d'environ 10^5 cellules de *B. cereus* végétatifs ou spores (Berthold-Pluta *et al.*, 2015; EFSA, 2016).

Parmi les facteurs qui inhibent la survie de *B. cereus* dans le tractus gastro intestinal humain on peut citer : Le faible pH, la présence d'enzymes digestives (pepsine) dans l'estomac, l'insuffisance d'oxygène, la présence de la bile dans l'intestin grêle, et la microflore indigène dans la partie inférieure du tractus gastro intestinal. La capacité de *B. cereus* (spores /cellules végétatives) d'adhérer aux entérocytes et

l'interaction possible entre les cellules végétatives de cette espèce et les cellules épithéliales de l'intestin sont aussi des aspects qui contribuent à l'intoxication alimentaire par *B. cereus* (Ceuppens *et al.*, 2012).

Bien que *B. cereus* est une cause bien connue de la maladie d'origine alimentaire, il n'est généralement pas signalé en raison de ses symptômes généralement bénins (Tableau 5).

I.2.5.1. Les entérotoxines et le syndrome diarrhéique associé

Le syndrome diarrhéique se trouve dans une toxi-infection générale (ou une infection à médiation par la toxine) qui résulte de l'ingestion des cellules ou des spores végétatives de *B. cereus*. Selon le type de l'aliment, ainsi que sur la manipulation d'un produit alimentaire, soit des cellules végétatives de *B. cereus* ou ses spores ou une combinaison des deux est présent dans l'alimentation. Cela peut avoir une incidence sur la dynamique de la production possible de la toxine diarrhéique dans l'intestin grêle, par rapport à la survie, la germination, la croissance et l'adhérence intestinale des spores de *B. cereus* et les cellules végétatives (Andersson *al.*, 1998; Clavel *et al.*, 2004; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008).

La maladie diarrhéique due à l'ingestion de spores de *B. cereus* est caractérisée par des douleurs abdominales et la diarrhée. La période d'incubation est de 8-16 h et les symptômes persistent pendant 12-24 h (Sim, 1998; Beattie et Williams, 2000; Granum, 2007). Le syndrome diarrhéique provoquée par *B. cereus* est médiée par une ou les trois entérotoxines diarrhéiques: les toxines tripartites hémolysine BL (HBL) et entérotoxine non hémolytiques (NHE), les deux formes de cytotoxine K (cytK-1 et cytK-2) (Fagerlund *et al.*, 2004) et peut-être entérotoxine T et entérotoxine FM (Guinebretière *et al.*, 2002; Moravek *et al.*, 2006). Les enzymes protéolytiques et le pH du tractus gastro-intestinal digèrent les entérotoxines si elles sont préformées dans les aliments. Les spores de *B. cereus* survivent à la digestion et peuvent germer dans l'intestin (Jensen *et al.*, 2003; Swiecickai *et al.*, 2006), tandis que les cellules végétatives peuvent produire des toxines dans l'intestin.

Tableau 5: Caractéristiques des intoxications alimentaires dues à *Bacillus cereus* (Rajkovic, 2014; Kumari, 2016).

Caractéristiques	Syndrome émétique	Syndrome diarrhéique
Cause principale	Toxine préformée dans les aliments	L'ingestion de cellules végétatives et les spores et la production de toxines dans l'intestin grêle
Aliments principalement impliqué	Aliments riches en amidon: riz, pâtes, pommes de terre, pâtisserie.	Aliments protéiniques: lait et produits laitiers, les produits carnés, pudding, les soupes, les sauces et les légumes
Symptômes	Nausées, vomissements, malaise dans certains cas d'insuffisance hépatique fatale	Diarrhée aqueuse et des douleurs abdominales
Temps d'incubation	≤5h	8-16h
Période de la maladie	6-24h	12-24h
Dose infectieuse	0,02-1,83mg/kg de poids corporel (10^5 - 10^8 cellules/g d'aliment impliqué)	10^5 - 10^8 UFC/g
Toxine associé	Cereulide	Hémolysine BL (Hbl), Entérotoxin non-hemolytic (Nhe) une cytotoxine K (CytK)
	Chaleur	Labile.
		Extrêmement stable (même à 121°C pendant 90 min)
Sensibilité de la toxine	pH	4-8
	Protéinases	Non résistante
		Résistante
Gènes	Cereulide synthétase (Ces), groupe de gènes (cesHPTABCD genes) cesA (10kb) et CesB (8kb): gènes de structure cesP:4'-phosphopantetheinyl transférase cesT: a thioestérase cesC et cesD: transporteur ABC	Complexe Hbl (hblCDA opéron) hblC: L2 (46 kDa) hblD: L1(38 kDa) hblA: B (37 kDa) Complexe Nhe (nheABC opéron) nheA: NheA (41 kDa) nheB: NheB (40 kDa) nheC: NheC (36 kDa) cytK: CytK (34 kDa)
Régulation génétique	Par Spo0A et AbrB	Par PlcR
Mode d'action	- Agit en tant que K-ionophore pour inhiber l'oxydation des acides gras dans les mitochondries. - Se lie aux récepteurs de 5-hydroxytryptamine 3 (5-HT3) de la sérotonine, stimule le vague à l'afférente, ce qui entraîne un vomissement - L'œdème cérébral et l'insuffisance hépatique du fulminate en raison de l'inhibition de l'oxydation des acides gras mitochondriaux - Empêche les cellules tueuses naturelles (cellules T) du système immunitaire humain	Hbl est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire Nhe est une toxine porogène, structurellement similaire à Hbl CytK est dermonécrotiques, cytotoxiques et hémolytiques

- **L'hémolysine BL (Hbl)**

L'hémolysine BL (Hbl) est la première des trois entérotoxines décrite chez *B. cereus*. C'est une protéine composée de trois sous-unités comprenant deux composants lytiques L2 et L1 codés par *hblC* et *hblD* respectivement et la protéine de liaison B codée par *hblA* (Heinrichs *et al.*, 1993). Un quatrième composant *hblB'*, dont la fonction est inconnue, codé par le gène *hblB'* (Voir figure 5).

Elle est capable de former des pores transmembranaires dans des cellules d'épithélium intestinal de lapin (Beecher et MacMillan, 1990).

Hbl est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique et elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire (Granum et Lund, 1997 dans Guinebretière, 2001).

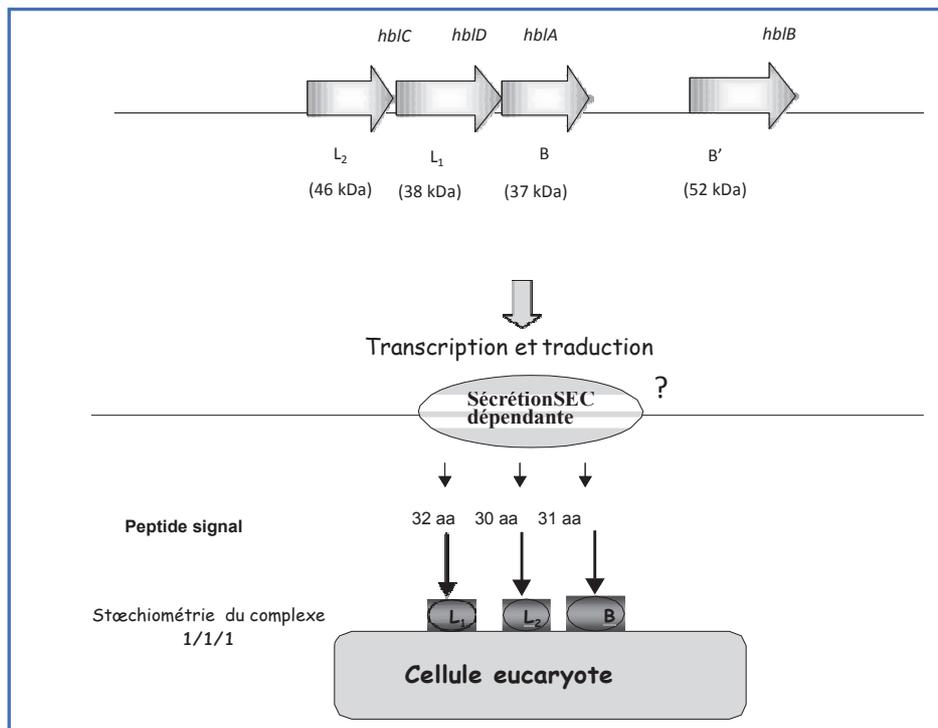


Figure 5 : Organisation génétique de l'opéron *hbl* et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Hbl (Esbelin , 2009).

- **L'entérotoxine Nhe (Non-Hemolytic Enterotoxin)**

L'entérotoxine non hémolytique Nhe se présente également sous la forme d'un complexe protéique tripartite comprenant NheA, NheB et NheC, codées par l'opéron

nheABC (Granum *et al.*, 1999). Cet opéron est systématiquement retrouvé chez les souches de *B. cereus* isolées de TIAC (Guinebretière *et al.*, 2008) (Voir figure 6).

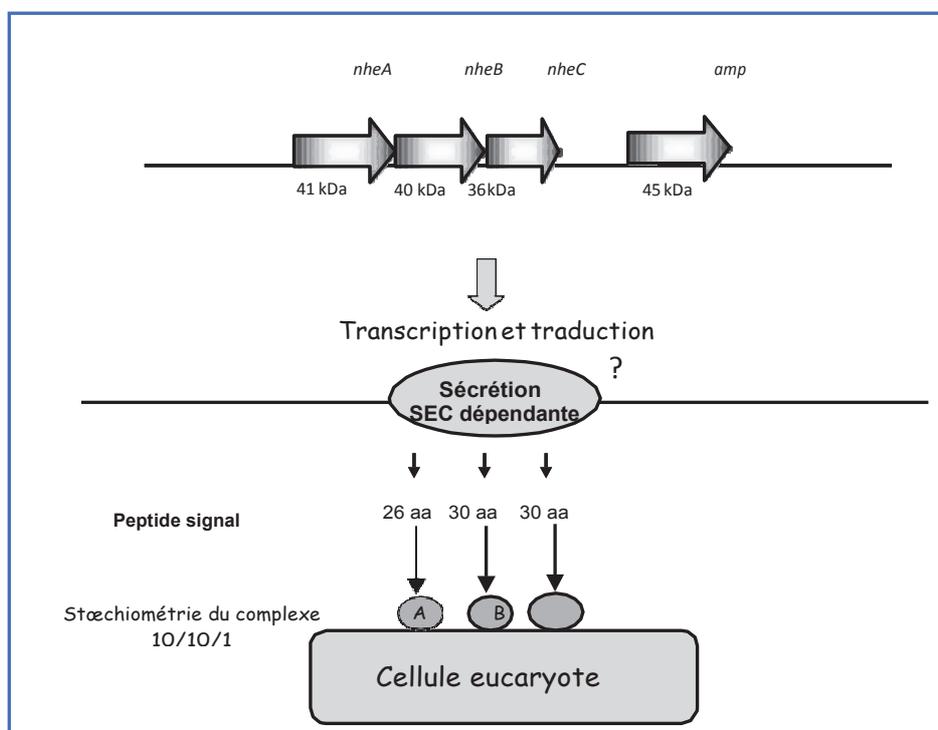


Figure 6 : Organisation génétique de l’opéron *nhe* et schématisation du devenir post-traductionnel des différents composants de la toxine Nhe (Esbelin , 2009).

L’entérotoxine Nhe présente une cytotoxicité équivalente à Hbl mais ne possède pas de caractère hémolytique. Nhe est capable de former des pores et de perturber l’intégrité de la membrane plasmique de cellules épithéliales entraînant ainsi une lyse cellulaire (Lindbäck *et al.*, 2004; Fagerlund *et al.*, 2008; Haug *et al.*, 2010).

Les trois composants sont indispensables pour l’activité biologique. L’activité cytotoxique maximale de Nhe sur cellules épithéliales est obtenue avec un ratio molaire de 10:10:1 pour NheA, NheB et NheC respectivement. Il a été montré qu’un excès de NheC inhibe la fixation de NheB. La faible quantité de NheC par rapport à celle de NheA et NheB est due à la présence d’un atténuateur de transcription situé en amont du gène *nheC*. Cet atténuateur de transcription stoppe la transcription 9 fois sur 10 (Lindbäck *et al.*, 2004). De plus, un ordre de fixation des trois composés sur les cellules épithéliales doit être respecté afin de conserver l’activité cytotoxique. NheA ne possède

pas la capacité de se fixer directement aux cellules cibles. NheB et NheC qui présentent une région hydrophobe sont responsables de l'adhérence de la toxine aux cellules cibles (Lindbäck *et al.*, 2010). Les composants de Nhe présentent des homologies entre eux mais aussi avec les composants de Hbl (Laouami, 2012).

- **La cytotoxine K (CytK)**

La cytotoxine K (CytK) fut découverte pour la première fois en 1998 chez une souche du groupe VII (NVH391/98), isolée d'une toxi-infection alimentaire qui a causé la mort de trois personnes en France (Lund *et al.*, 2000). Cette protéine de 34 kDa, codée par *cytK*, appartient à la famille des protéines à structure en tonneau β capables de former des pores dans les membranes des cellules épithéliales.

CytK est nécrotique, hémolytique et cytotoxique pour l'épithélium intestinal (Hardy *et al.*, 2001). Deux variants du gène *cytK* ont été caractérisés : (i) *cytK1* correspondant au variant original, présent chez toutes les souches du groupe VII et (ii) *cytK2* présent chez la majorité des souches des autres groupes (Fagerlund *et al.*, 2004 dans Guinebrière, 2001). On connaît moins entérotoxine FM (entFM) vérotoxique et hémolytiques cité par Asano *et al.* (1997). Plusieurs autres entérotoxines ont été décrites (hémolysine II, hémolysine III, cereolysine AB, cereolysine O), mais leur implication réelle dans la de toxi-infections alimentaires causée par *B. cereus* reste à confirmer (Michelet *et al.*, 2006; Rajkovic *et al.*, 2008).

I.2.5.2. La toxine émétique et le syndrome émétique associé

La toxine responsable du syndrome émétique est la céréulide. Cette toxine émétique produite par *B. cereus* a été isolée et déterminée par Agata *et al.*, (1994). Il s'agit d'un cyclo-dodécadepsipeptide cyclique appelé cereulide, synthétisé pendant la phase exponentielle et stationnaire de croissance bactérienne. Ce complexe est composé d'une triple alternance de 12 acides aminés et esters de formule suivante : [D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]₃. Sa structure est présentée dans la figure 7.

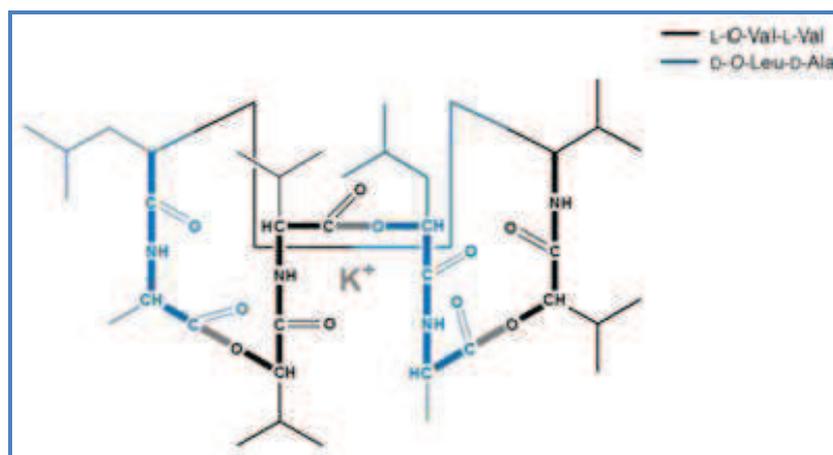


Figure 7 : La structure chimique de la toxine céréulide [$D-O\text{-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val}$]₃, (Marxen *et al.*, 2015).

Le mécanisme d'action de la toxine émétique est encore peu connu. Son action correspond *in vivo* à une stimulation du système vague (Agata *et al.*, 1995), et à une inhibition du cycle d'oxydation mitochondrial des acides gras (Mahler *et al.*, 1997), observée également *in vitro* sur cellule Hep 2 (Carcinoma human Larynx cells). De fortes doses injectées chez la souris peuvent entraîner une dégénérescence des cellules hépatiques, avec rémission après plusieurs semaines (Yokoyama, 1999). Les voies de biosynthèse de la toxine émétique ne sont pas élucidées. Sa structure fait penser qu'il s'agit d'un produit enzymatique plutôt que le produit d'un gène (Granum et Lund, 1997). La toxine émétique, préformée dans l'aliment, est particulièrement résistante à la chaleur (90 min à 121°C), aux pH extrêmes et à la protéolyse (Shinagawa *et al.*, 1995; Granum et Lund, 1997). Cela rend difficile sa destruction lors de la cuisson de l'aliment ou lors du transit intestinal. La toxine est produite de manière optimale entre 25 et 30°C (Szabo *et al.*, 1991) et n'est plus synthétisée au-delà de 40°C. Cependant, certains auteurs ont montré récemment que les niveaux de toxine émétique produits étaient plus élevés à 12-15°C qu'à 30°C dans du lait écrémé (Finlay *et al.*, 2000), et qu'elle n'était plus produite au-delà de 37°C (Guinebretière, 2001).

La cereulide est considéré comme le plus dangereux pour la santé humaine des toxines produites par *B. cereus*, car elle est responsable de la mort de jeunes personnes en bonne santé. La toxine préformée dans les aliments peut provoquer des symptômes

0,5-5 h après l'ingestion de l'aliment contaminé. La maladie est caractérisée par des nausées et des vomissements durable pour 6-24 h (Agata *et al.*, 1995).

Bien que *B. cereus* ss, ou *B. cereus* comme il est généralement appelé, est principalement associée à des troubles gastro-intestinaux et les infections oculaires graves, c'est un agent pathogène opportuniste humain associée à une multitude d'autres infections locales et systémiques telles que la parodontite, nécrosante infections, endocardite, nosocomiale acquis bactériémie, ostéomyélite, septicémie, abcès du foie, la pneumonie et la méningite, particulièrement chez les patients post-opératoires, les personnes immunodéprimées, les toxicomanes par voie intraveineuse et nouveau-nés (Bottone, 2010).

Dans la phase stationnaire précoce, *B. cereus* produit plusieurs composés (les enzymes de dégradation, facteurs cytotoxiques et des protéines de surface cellulaire) qui pourraient contribuer à la virulence (Tran *et al.*, 2010). Cependant, il y a encore peu de connaissance et d'appréciation du rôle de *B. cereus* dans ces infections, cliniques graves et souvent mortelles chez l'homme (Ramarao et Sanchis, 2013) (Voir figure 8).

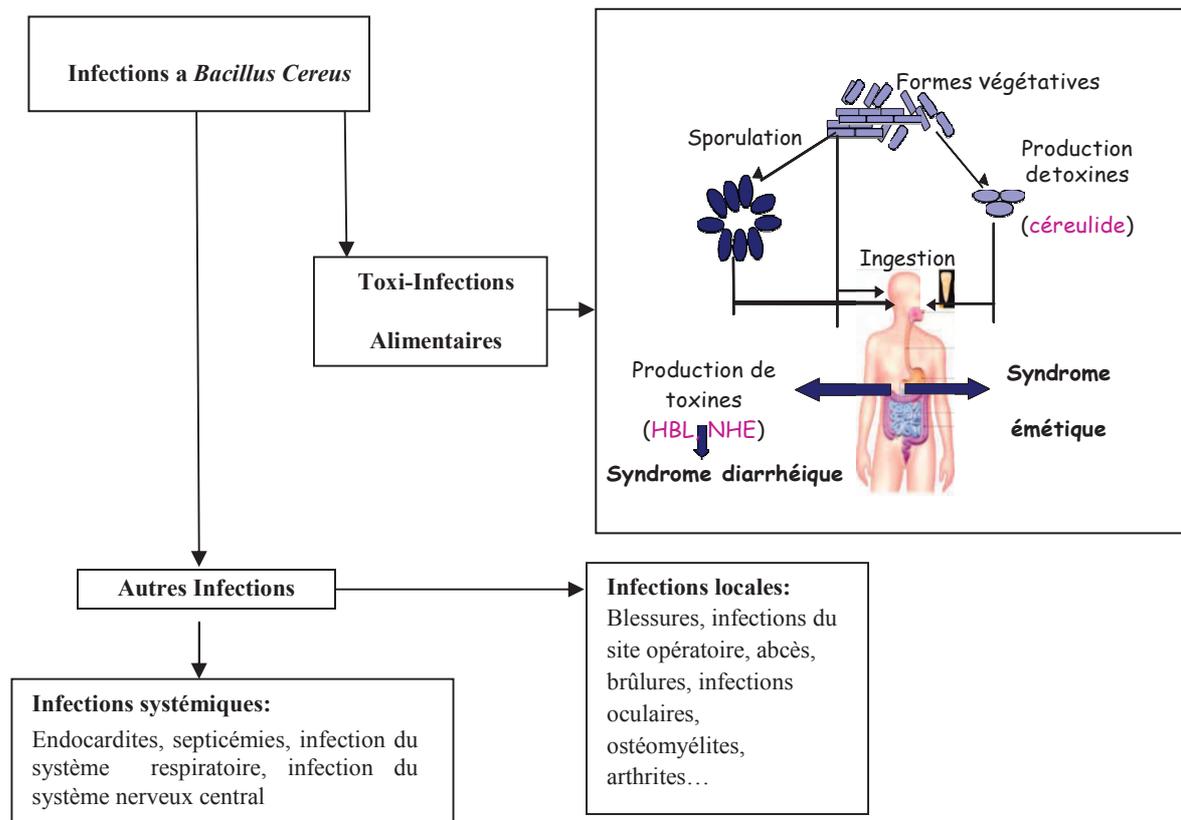


Figure 8 : Représentation schématique des infections à *Bacillus cereus* chez l'homme (Teyssou *et al.*, 1998; Esbelin, 2009).

I.2.6. Problèmes causés par *Bacillus cereus* dans les industries laitières

De nombreuses espèces microbiennes peuvent être à l'origine d'altérations des aliments, parmi elles, les spores bactériennes qui constituent souvent un problème le plus difficile à résoudre. En effet, les spores sont connues pour leur résistance. Leur inactivation complète est souvent impossible sans altérer la qualité de l'aliment, comme c'est le cas pour *B. cereus* (Merzougui *et al.*, 2013). Ceci serait en partie dû au fait que les spores peu hydratées sont généralement hydrophobe et possèdent une surface très peu chargée et une morphologie particulière. Leur adhésion aux surfaces alimentaires et leur développement sous forme de biofilms peut entraîner des risques importants pour la santé des consommateurs (Bartoszewicz *et al.*, 2008; Majed *et al.*, 2016).

Les spores de *B. cereus* sont ubiquitaires et peuvent contaminer les aliments via les matières premières. Elles sont capables de résister aux traitements thermiques ainsi qu'à d'autres procédures telles que la déshydratation, la dessiccation, la désinfection et autres facteurs environnementaux, qui empêchent le développement d'autres bactéries capables de rentrer en compétition avec elles. Ce pathogène alimentaire peut ainsi causer de sérieux problèmes tels que le changement de texture et le développement de saveurs indésirables dans l'industrie alimentaire. Aussi, compte tenu de sa psychrotolérance, cette bactérie constitue un potentiel pathogène émergent des produits réfrigérés prêts à la consommation (Daryaei *et al.*, 2013 dans Merzougui *et al.*, 2013).

Dans l'industrie laitière, des spores de *Bacillus cereus* sont des contaminants importants car ils peuvent significativement affecter la sécurité et la qualité des produits. L'apparition de souches émétiques et diarrhéiques productrices de toxines de *B. cereus* dans la chaîne de production laitière a été largement rapporté. La majorité des souches isolées, des produits laitiers, sont cytotoxiques et productrices d'entérotoxines NHE et HBL (Borge *et al.*, 2001 dans Kumari, 2016).

Les bactéries du groupe *B. cereus* sont non seulement responsables de TIAC mais peuvent aussi détériorer les qualités organoleptiques des aliments et considérés comme des agents d'altération des produits alimentaires. Cette altération entraîne de nombreux problèmes sanitaires et économiques pour le secteur agroalimentaire.

Les membres du groupe *Bacillus cereus* sont parmi les micro-organismes d'altération les plus importants dans l'environnement des produits laitiers (Lücking *et al.*, 2013). Grâce à leur résistance accrue aux traitements thermiques appliqués dans les

industries laitières, ils peuvent germer et produire des enzymes extracellulaires (Chen *et al.*, 2004).

Ce sont ces enzymes extra-cellulaires qui contribuent à la réduction de la durée de conservation du lait et des produits laitiers transformés en dégradant les composants du lait (**Tableau 6**). Ces dernières donnent au lait une saveur anormale et des défauts de structure (De Jonghe *et al.*, 2010). Les mécanismes altérant les propriétés physiques et la saveur du lait sont complexes.

La présence de protéase peut conduire à l'amertume, la coagulation et la gélification du lait (Chen *et al.*, 2003; Furtado, 2005). L'activité protéolytique provoque alors un défaut dans le caillage (De Jonghe *et al.*, 2010).

D'autre part, les lipases ont été responsables de défauts de produits laitiers, et contribuent également à la saveur désagréable, comme la rancidité, butyrique, et le savon dans le lait et les produits laitiers (Furtado, 2005). La lipolyse est connue pour contribuer à la fois à la saveur désirable et indésirable aux produits laitiers (Lücking *et al.*, 2013 ; Kumari et Sarkar, 2014). Ainsi, cette dégradation donne une saveur rance et fruitée au lait, tout comme les lecithinases peuvent donner au lait un aspect de crème caillée en raison de l'agrégation des globules gras (De Jonghe *et al.*, 2010).

Parmi les moyens de lutte contre ce pathogène dans les industries agro-alimentaire ; il existe des techniques non thermiques (Utilisation de détergents et désinfectants), Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH), Ultra violet continu (UV). Ainsi les traitements thermiques pour lesquels on s'intéresse dans cette étude.

I.2.7. Les traitements thermiques

Les traitements thermiques sont couramment utilisés en industrie agro-alimentaire. Différents types de traitements thermiques existent en fonction du résultat souhaité.

- La pasteurisation : Traitement thermique modéré permettant la destruction des microorganismes pathogènes et d'un grand nombre de microorganismes d'altération. La température utilisée est généralement inférieure à 100°C et la durée est de quelques secondes à quelques minutes. Ce traitement thermique peut être réalisé de différentes manières : à basse température (62,8°C pendant 30 minutes en discontinue) ou à haute température (71°C pendant 1 à 2 min) ou bien à très haute température (92 à 94°C pendant 2 à 4 sec) : flash pasteurisation (Caudrillier, 2008).

Tableau 6: Effets des enzymes produites par *Bacillus cereus* sur la qualité organoleptique du lait et des produits laitiers (Kumari, 2016).

Enzyme	Principe d'action	Produit	défaut de qualité
Protéase	Hydrolyse de la caséine, ce qui entraîne la formation d'un gel (coagulation)	Le lait pasteurisé/ stérilisé	Caillage doux, flaveur anormale, amer, étrangère, impure
		Crème / beurre Fromage	Flaveur anormale, rendement inférieur, temps de coagulation plus court en raison de la concentration plus élevée des acides aminés libres qui stimulent la croissance de la culture starter
Lipase	L'hydrolyse des triglycérides du lait, résultant en une concentration élevée d'acides gras libres	Lait en poudre	Amertume, Rancissement, flaveur anormale, l'amertume, savonneuse
		Pasteurisée / stérilisée lait, crème, beurre, fromage	
Lécithinase et phospholipases	Perturbation de la structure membranaire des globules gras, aboutissant à la dégradation de la matière grasse du lait	Lait en poudre Lait	Rancissement crème caillée

La pasteurisation reste néanmoins inefficace pour détruire les spores bactériennes de *B. cereus*, beaucoup plus résistantes à la chaleur que les cellules végétatives (Prescott *et al.*, 2003).

- La stérilisation est un traitement thermique qui a pour finalité de détruire toute forme microbienne vivante. Le traitement à ultra haute température (UHT) consiste à chauffer le produit à une température assez élevée, entre 135°C et 150°C, pendant un temps très court, de 1 à 5 secondes. Le produit stérilisé est ensuite rapidement refroidi puis conditionné aseptiquement (Caudrillier, 2008; Merzougui *et al.*, 2013).

I.2.8. Facteurs influençant la thermo-résistance

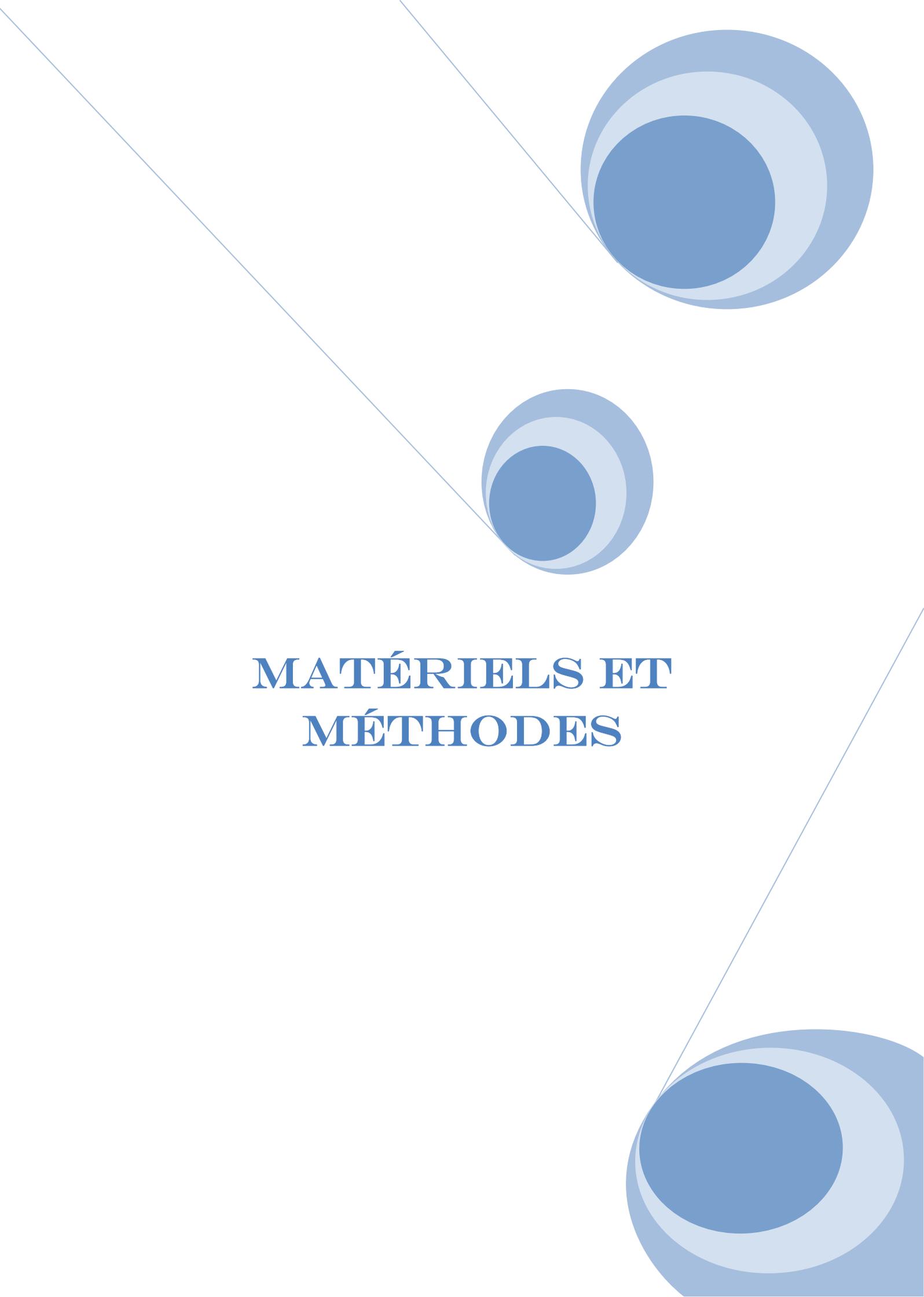
Les conditions environnementales affectent les caractéristiques des spores bactériennes produites, comme temps de sporulation et le type et la forme des structures sporales. Étant donné que ces structures jouent un rôle primordial dans la résistance des spores, la variation des conditions environnementales de sporulation influence alors indirectement la résistance des spores formées (Couvert, 2002).

Pendant de nombreuses décennies, seule la température était prise en compte dans le calcul des barèmes de pasteurisation et de stérilisation. La tendance actuelle est l'intégration de nouveaux facteurs environnementaux jouant également un rôle prépondérant tels que le pH et l'activité de l'eau.

Le pH est connu pour avoir une forte influence sur la résistance thermique des micro-organismes. Un pH acide (pH = 4) du milieu lors du traitement peut provoquer une résistance thermique plus faible de spores, comparé à un pH neutre (Palop *et al.*, 1999).

L'activité de l'eau (a_w) est tout comme le pH, un élément essentiel dans la détermination de la thermo-résistance des microorganismes. À l'inverse d'un pH bas, qui favorise la destruction thermique, une faible a_w lors du traitement provoquera une augmentation de la résistance à la chaleur. En revanche, une faible activité de l'eau ($<0,98$) du milieu de récupération a montré une inhibition de la germination et de la croissance de spores de *B. cereus* (Martinez *et al.*, 2007).

Le type de matrice alimentaire semble aussi avoir une influence sur la thermorésistance de spore de *Bacillus cereus*. Les produits alimentaires sont plus complexes et potentiellement incluent des composants qui pourraient protéger les spores (Leguerinel *et al.*, 2005 Samapundo *et al.*, 2014). Il est donc plus probable que les composés macromoléculaires dans les aliments tels que: la matière grasse, les protéines et l'amidon peuvent avoir un effet sur la thermorésistance des spores dans les produits alimentaires (Samapundo *et al.*, 2014).

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of blue. These circles are positioned in the top right, center, and bottom right areas. A thin blue line runs diagonally from the top left towards the center, and another thin blue line runs diagonally from the top right towards the bottom right.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

II. Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire, au Biomédical et à l'Environnement (LAMAABE) de Tlemcen, le Laboratoire Universitaire de Biodiversité et d'Ecologie Microbienne (LUBEM), site de Quimper Université de la Bretagne occidentale France, Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique (CNRST) à Rabat, Maroc et le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université de Mustapha Stambouli de Mascara.

II. 1. Origine des échantillons de fromage fondu

Soixante cinq (65) boîtes de fromage fondu représentant 7 marques différentes ont été achetées chez des commerçants de détail de la wilaya de Mascara (360 Km l'Ouest d'Alger) durant la période allant de Février 2011 à Mai 2013. Les prélèvements ont été effectués à partir de points de vente où les fromages étaient conservés au présentoir frigorifique. Les échantillons choisis avaient consommé plus de 50% de leur durée de vie. Chaque boîte comprend 16 portions. Six marques (codées A à F dans ce travail) étaient représentées par 10 boîtes chacune. La 7^{ème} était représentée par 5 boîtes et était considérée comme fromage de référence (notée G dans ce travail).

Les échantillons prélevés ont été transportés dans une glacière au laboratoire de Microbiologie du département d'Agronomie de l'Université de Mascara (Algérie).

Les marques B, E et F sont fabriquées à Oran (ouest d'Algérie). Alors que les marques A, C, D, et G sont fabriquées à Alger. Les marques D et G appartiennent à des grandes entreprises tandis que les marques A, B, C, E et F sont fabriquées par des PME voire des TPE.

Dans ce travail et pour le besoin d'évaluation, nous avons considéré le fromage «G» comme la référence (ou témoin de comparaison). Ce fromage est, en effet, celui qui détient la plus grande part de marché en Algérie. Il s'agit d'une marque internationale installée en Algérie depuis 2001. D'après les services du CACQE de la wilaya de Nâama (Communication personnelle), les échantillons de cette marque sont toujours révélés conformes aux normes algériennes en vigueur en ce qui concerne les paramètres analysés.

Alors que la plupart des fromages étudiés sont en réalité des préparations fromagères fondus et non pas des fromages fondus à proprement dit.

Un exemple de diagramme de fabrication de fromage fondu d'après le fabricant B est illustré dans la figure 9.

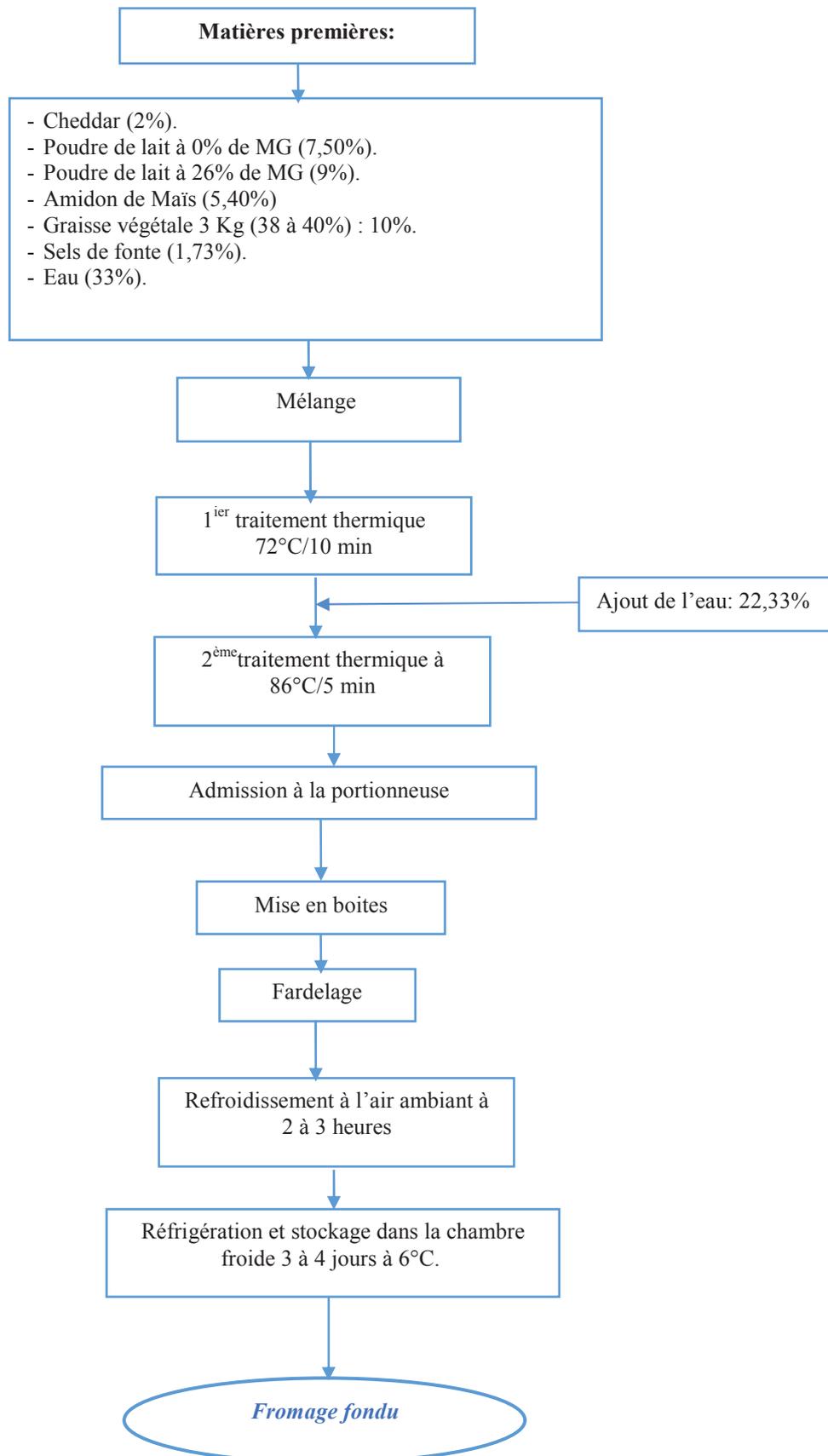


Figure 9: Processus de fabrication de fromage fondu utilisé: L'exemple de la marque B.

II.2. Analyses physico-chimiques et biochimiques de fromage fondu

II.2.1. Détermination de l'extrait sec total

La perte de masse d'un produit lorsqu'il est soumis à une dessiccation renseigne sur sa teneur en eau. La dessiccation à $103\pm 2^{\circ}\text{C}$ d'une quantité déterminée de produit, jusqu'à masse constante donne sa teneur en eau (Norme Algérienne: N°10.96.25). Dans notre cas 5g de fromage fondu sont mis dans une capsule en porcelaine. Cette quantité est séchée à une température de $103\pm 2^{\circ}\text{C}$, pendant 3 heures. Dans une étuve à la pression atmosphérique la capsule est alors placée dans un dessiccateur pour refroidissement. L'échantillon est pesé puis introduit de nouveau dans l'étuve. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un poids constant (en réduisant la durée de séchage à 30 min) (Norme Algérienne : N°10.96.25).

La teneur en eau est exprimée selon la formule suivante :

$$\text{Teneur en eau (H) exprimé en \%} = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où :

m_0 : Masse en grammes de la capsule vide.

m_1 : Masse en grammes de la capsule et de la prise d'essai avant dessiccation (échantillon frais).

m_2 : Masse en grammes de la capsule et de la prise d'essai après dessiccation (échantillon séché).

Par différence, on obtient le taux de matière sèche.

$$100 \% - H = \text{EST}$$

EST: Extrait sec total

H : Humidité.

II.2.2. Détermination de la matière Grasse par la méthode butyrométrique de VAN GULIK

Après dissolution des protéines du fromage par addition d'acide sulfurique, s'opère la séparation de la matière grasse par centrifugation dans un butyromètre de Van Gulik, la séparation étant favorisée par l'addition d'une petite quantité d'alcool iso-amylque (Norme Algérienne : NA N° 10.96.14). Dans notre cas, 3g de fromage fondu ont été pesés dans un godet du butyromètre de Van Gulik puis introduits dans le butyromètre 10 mL d'acide sulfurique ($d=1,522\pm 0,005$) ce qui correspond à une fraction volumique de 61,72 % 62,63% de H_2SO_4 . Ensuite le butyromètre a été placé dans un bain Marie à $65\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant

5minutes. Il est ensuite retiré du bain d'eau et agité énergiquement pendant 10 secondes. Les opérations de chauffage et d'agitation sont répétées jusqu'à dissolution complète des protéines. Ensuite il a été ajouté 1 mL d'alcool iso-amylque dans le butyromètre après l'avoir retiré du bain Marie. Enfin le mélange est centrifugé pendant 10 minutes.

La lecture des résultats est effectuée directement sur le butyromètre dont la teneur en matière grasse est calculée comme suit :

$$\text{MG} = (\text{B} - \text{A}) \quad (\text{g}/100\text{g})$$

Avec:

A: La lecture faite à l'extrémité inférieure de la colonne de la matière grasse.

B: La lecture faite à l'extrémité supérieure de la colonne de la matière grasse.

En se basant sur cette détermination et la détermination de l'extrait sec total, le rapport Gras/Sec a été calculé. C'est un rapport important en industrie fromagère pour le classement des fromages ainsi que pour la qualité marchande de ces produits.

II.2.3. Détermination de la teneur en protéines par titration au formol

La méthode utilisée pour l'estimation des protéines est basée sur la combinaison du formaldéhyde avec les groupements basiques de la lysine et de l'arginine et la libération d'un proton par site de fixation. Pour le mode opératoire nous nous sommes inspirés de la méthode de [Wolfschoon et Vargas \(1978\)](#). Pour ce faire, 1g de fromage fondu a été dilué dans 9mL d'eau distillée. 0,4mL d'oxalate de potassium saturé et 1mL de phénophtaléine y sont ajoutés. Le titrage du mélange a été effectué en présence de NaOH (0,1N) jusqu'à l'obtention d'une couleur rose pale. Ensuite on y ajoute 2mL de formaldéhyde. Le titrage du mélange est effectué toujours en présence de NaOH (0,1N) jusqu'à l'apparition de la couleur rose pale. Le mélange de 10mL d'eau distillée avec 2 mL de formaldéhyde est titré en présence de NaOH. Il sert de témoin. La teneur des protéines est exprimée selon la formule suivante :

$$\text{P} = (\text{V}_1 - \text{V}_2) \times 1,71 \quad (\%)$$

P : Teneur en protéines

V₁ : Volume de titration de l'échantillon.

V₂ : Volume de titration de formaldéhyde

1,71: Coefficient de BAYNE.

II.2.4. Détermination de la matière minérale (Cendres)

La détermination du taux de cendres consiste en l'incinération du fromage fondu étudié à $525 \pm 25^\circ\text{C}$ dans un lent courant d'air chaud dans le four à moufle à $525 \pm 25^\circ\text{C}$ en vue de la minéralisation de la matière organique. L'incinération est poursuivie jusqu'à obtention de cendres blanchâtres. Le résidu obtenu est alors pesé (Norme Algérienne: NA N°10.96.03).

Dans le cadre de cette étude, 5g de fromage fondu (trois répétitions pour chaque échantillon) ont été mis dans des capsules en porcelaine.

La teneur en cendres est exprimée en pourcentage du poids frais du fromage

$$\text{Teneur en cendres exprimé en \%} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100$$

Où:

m_0 : Masse en grammes de la capsule vide.

m_1 : Masse en grammes de la capsule et de la prise d'essai (échantillon frais).

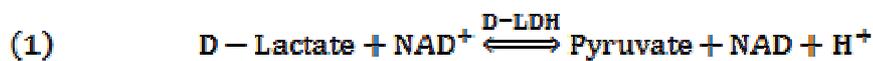
m_2 : Masse en grammes de la capsule et des cendres obtenues (cendres).

II.2.5. Détermination de l'acide D et L- lactique

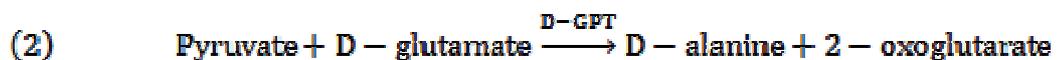
Le dosage des acides D- et L-lactique a été réalisé en adaptant les recommandations du kit (MEGAZYME D-LACTATE and L-LACTATE) selon la méthode décrite par Noll (1988) et Gawehn (1988).

La quantification de l'acide D-lactique nécessite une réaction enzymatique qui se déroule en 2 étapes.

La première étape de cette réaction consiste en l'oxydation de l'acide D- lactique (D-lactate) en pyruvate par la D-lactate déshydrogénase (D-LDH) en présence du Nicotinamide-Adénine Dinucléotide (NAD^+).



Afin de piéger le pyruvate formé, une deuxième étape est nécessaire. Dans cette étape, le pyruvate est converti en D-alanine par la D-glutamate-pyruvate transaminase (D-GPT). L'ajout du D-glutamate est indispensable pour activer la réaction.



La quantité du NADH formé lors des deux étapes de la réaction est stoechiométrique avec la quantité d'acide D-lactique (1mole d'acide lactique produit 1mole de NADH).

Pour le mode opératoire, 1g de fromage fondu est homogénéisé dans 70 mL d'eau distillée à 60°C pendant 20 minutes sous agitation jusqu'à dispersion totale. On complète à 100mL avec de l'eau distillée (concentration finale:1% P/V). On place au réfrigérateur pendant environ 20 min pour permettre la séparation des graisses, le mélange est alors filtré.

Pour le dosage, 0,1 mL de la solution de fromage filtré est mélangé avec 0,62mL d'une solution enzymatique (Tampon glycyl-glycine, NAD⁺, D-GPT) fournie dans le kit. On incube pendant 3minutes. L'absorbance est mesurée à 340nm (A1). On ajoute ensuite 0,02mL de la suspension de D-lactate déshydrogénase. On laisse incuber pendant 5minutes et on procède à la lecture de l'absorbance à 340nm (A2).

La concentration de l'acide D-lactique est calculée de la manière suivante:

$$C = \frac{V \times 90}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A \text{ acide D - lactique} \quad [\text{g/L}]$$

Où:

C: Concentration de l'acide D-lactique

V: Volume final dans la cuve [mL]

90: Masse moléculaire de l'acide D-lactique [g/mol]

ε: Coefficient d'extinction du NADH à 340 nm = 6300 [l x mol⁻¹xcm⁻¹]

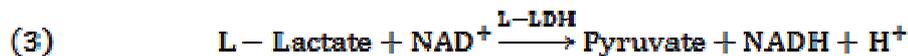
d: Trajet optique [cm]

v: Volume de l'échantillon [mL]

ΔA acide: Différence d'absorbance de l'échantillon - différence d'absorbance du blanc.

Remarque

Pour le dosage de l'acide L-lactique, le principe reste le même. L'acide L-lactique (L-lactate) est oxydé en pyruvate par le nicotinamide-adénine dinucléotide (NAD⁺) et la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) (réaction 3). La réaction 2 est conservée.



II.2. 6. Détermination du pH

La mesure du pH du produit consiste à introduire l'électrode du pH-mètre dans l'échantillon après réglage de la température d'étalonnage. La lecture se fait directement sur le pH-mètre. Selon la norme AFNOR (1980), la sonde du pH-mètre (Crison microph

2001) a été introduite directement dans l'échantillon de la pâte de fromage à une température de 25°C. La mesure a été répétée trois fois pour chaque échantillon.

II.2. 7. Détermination de l'activité de l'eau (a_w)

La détermination de l' a_w repose sur le principe qui consiste à mettre le produit en équilibre thermodynamique avec l'atmosphère d'une micro-enceinte, puis à déterminer les caractéristiques de l'air ainsi conditionné par le produit (Frayssinet et Fremy, 1991).

L' a_w des sept échantillons de fromage fondu a été mesuré avec l' a_w -mètre (GBX France Scientific Instruments, model FA-st/1). L'hygromètre à miroir permet de déterminer la température de rosée de l'air qui est en contact et en équilibre avec l'échantillon. L' a_w est fonction de la température de rosée et celle de l'échantillon. L'appareil est préalablement calibré avec des solutions aqueuses saturées de : KCl ($a_w=0,843$) et NaCl ($a_w=0,753$).

La coupelle de l' a_w mètre est remplie avec l'échantillon de fromage fondu. La mesure a été répétée trois fois de chaque échantillon.

II.2. 8. Détection de produits amylicés dans les fromages fondus

La détection de présence d'un produit amylicé dans un produit alimentaire est basée sur le principe d'iodométrie. La fixation par les colloïdes de l'iode libre en solution aqueuse produit une coloration bleue. Cette coloration indique la présence d'amidon dans le produit analysé (Norme Algérienne: NA N° 10.96.22).

Pour le protocole expérimental, 1g d'échantillon de fromage fondu est mis dans un tube où furent ajoutés 20 mL d'eau distillée. Le tube est agité et mis dans un bain d'eau bouillante pendant 5 minutes puis refroidi avant d'y ajouter 0,5 mL de la solution d'iode (à 1% d'Iode et à 2% d'Iodure de potassium KI). La présence d'un produit amylicé est caractérisée par l'apparition d'une coloration bleue plus ou moins intense du liquide, ainsi que par la précipitation de grains bleus au fond du tube.

II.3. Analyses bactériologiques

II.3.1. Préparation des échantillons pour l'analyse

2 ou 3 portions ont été mélangées de chaque échantillon représentant chaque marque de fromage fondu et ont été utilisées pour l'analyse bactériologique. Après désinfection de l'emballage avec l'alcool. On pèse 25 grammes de cette quantité du

fromage fondu, on ajoute 225mL de Tryptone Sel Eau (TSE) puis homogénéisé dans un stomacher (Lab- Blender 400). Ceci constitue la dilution mère 10^{-1} .

A partir de la dilution mère, une série de dilutions décimales successives est réalisée (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) dans le TSE (**Voir figure 10**). Pour chaque marque de fromage, 3 déterminations ont été effectuées.

II.3.2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale à 30°C

A partir des dilutions décimales, on porte aseptiquement 1 mL dans une boîte de Pétri vide identifiée et préparée à cet usage. On verse alors environ 15 mL de milieu gélosé Plat Count Agar (PCA) fondu et maintenu en fusion à 45°C. L'inoculum est mélangé à la gélose, par agitation douce et circulaire sur la paillasse. On laisse solidifier sur la paillasse, et on rajoute une deuxième couche d'environ 4 mL du même milieu (NF EN ISO 4833-1: 10-2013) (Deux boîtes sont utilisées pour chaque dilution).

Lecture et interprétation.

On dénombre les colonies. On retient les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives.. Le résultat est rapporté en UFC/g de fromage à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma c}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

Où:

N: Nombre d'UFC/g de fromage

ΣC: Somme des colonies comptées sur les boîtes retenues de deux dilutions successives et contenant entre 30 et 300 colonies;

V : Volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte en mL;

n₁: Nombre des boîtes retenues à la première dilution;

n₂: Nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution;

d: Taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

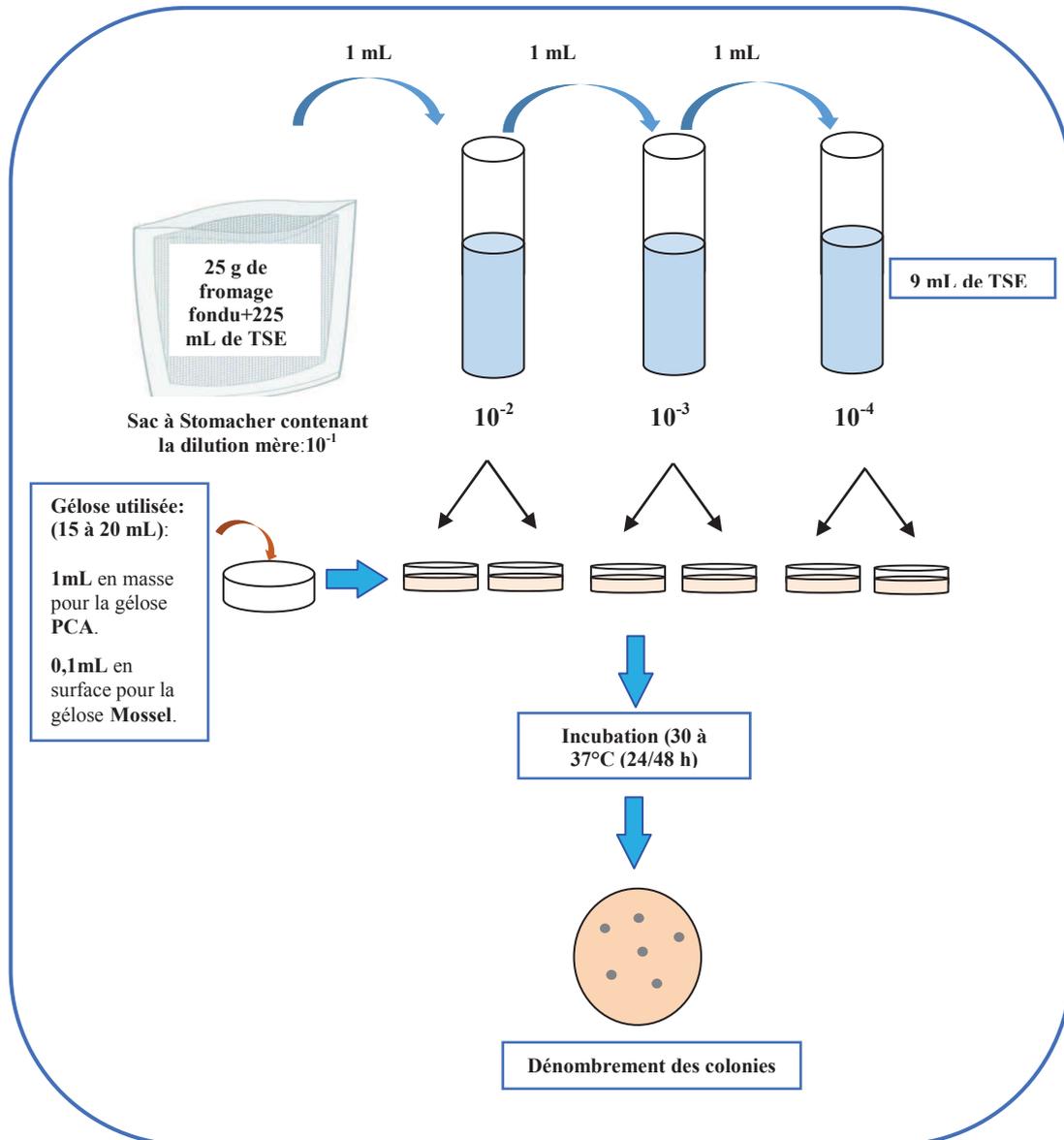


Figure 10: Protocol de préparation de dilutions en cascade et d'ensemencements.

II.3.3. Dénombrement de *Bacillus cereus*

Le dénombrement de *Bacillus cereus* a été effectué suivant la méthode préconisée par la norme NF EN ISO 7932 (2005). Elle consiste à dénombrer les cellules de *Bacillus cereus* présomptifs. En se basant sur l'ensemencement des échantillons sur la gélose sélective Mossel complète (additionné de jaune d'œuf et de la polymyxine B) (**Voir composition en annexe 1**).

25 grammes de fromage fondu ont été mélangés avec 225mL de Tryptone Sel Eau, homogénéisé dans un stomacher (Lab- Blender 400). Des dilutions décimales ont été

préparées à partir de la dilution mère. 0,1 mL d'inoculum de chaque dilution a été étalé sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Mossel complet en double (Institut Pasteur d'Alger). L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 à 48 heures. Seules les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies ont été retenues. Les colonies de *Bacillus cereus* présentent les caractéristiques suivantes : Grandes, Mannitol- roses presque toujours entourées d'une zone de précipitation (lécithinase+). Après le dénombrement, cinq colonies caractéristiques au maximum par boîte retenue ont été repiquées par stries sur gélose au sang de mouton et incubées pendant 24 h à 48 h à 37°C.

II.3.3.1. L'étude des caractères morphologiques des isolats retenus

- **Examen macroscopique**

Les éléments d'identification macroscopiques sont: La forme des colonies, la taille des colonies, la couleur des colonies, l'élévation, l'opacité et la surface (Guiraud, 2012).

Les caractéristiques utilisées pour le diagnostic sur la gélose Mossel sont : l'aspect des colonies, la précipitation de la lécithine hydrolysée et l'absence d'utilisation du mannitol par *Bacillus cereus*. Les colonies caractéristiques de *Bacillus cereus* sont crénelées, de différents diamètres, présentant une couleur caractéristique rose, entourées d'un précipité de jaune d'œuf de couleur identique. Ces critères distinguent *Bacillus cereus* des autres espèces.

Une souche de référence *Bacillus cereus*: B.C / ATCC/14579préalablement préparée selon la technique conseillée par l'équipe du laboratoire de sécurité et qualité des produits d'origine végétale de l'INRA d'Avignon, (France) a servi de témoin de comparaison:

- **Examen microscopique**

Pour cet examen l'observation avec la coloration de Gram et de la spore ont été effectuées.

Coloration de Gram

C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées. Cette coloration permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram-), alors que celles qui n'en possèdent pas vont retenir le colorant (Gram+) (Perry et al., 2004). A cet effet une coloration de Gram a été effectuée pour chaque colonie isolée. L'observation microscopique des cellules est ensuite réalisée avec un objectif à immersion (x100) (Prescott et al., 2003).

Coloration de spores : Méthode au vert de Malachite

Cette méthode nous permet la mise en évidence des spores dans les bactéries. Son principe repose sur l'utilisation combinée de l'action de la chaleur et une forte concentration du colorant, vert de Malachite (Guiraud, 2012). L'observation microscopique se fait grâce à l'objectif x100 avec de l'huile à immersion.

II.3.3.2. Etude des caractères physiologiques et biochimiques des isolats

L'étude des caractères physiologiques et biochimiques: Test de thermo-résistance, dégradation du mannitol, test de l'hémolysine, recherche de la catalase, test de l'hydrolyse de la lécithine (Guiraud, 1998 et 2012).

II.3.4. Préparation des suspensions sporales de *Bacillus cereus*

La préparation des suspensions de spores de *Bacillus cereus* a été réalisée selon la technique décrite par Choma *et al.* (2000). A cet effet des précultures de 24 h à 37°C de souches de *Bacillus cereus* étaient réalisées dans le milieu BHI (Brain Heart Infusion). Des boîtes de Pétri contenant la gélose FNA (Fortified Nutrient Agar) (**Voir composition en Annexe 1**), sont alorsensemencées en surface avec un volume de 300 µL de chacune de ces précultures.

Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 5 à 7 jours jusqu'à l'obtention d'un taux de sporulation de plus de 90% vérifié par examen microscopique. Les boîtes de Pétri sont alors recouvertes de 2mL d'eau déminéralisée stérile froide et leur surface est raclée à l'aide d'un râteau. Les spores récupérées sont mises en suspension dans de l'eau distillée stérile froide. La suspension des spores sont ensuite lavées à l'eau distillée stérile et centrifugées à 500tr/min pendant 5 minutes. Après récupération du surnageant, on procède à un lavage et une centrifugation à 5000 tr/min pendant 30 minutes. Le culot obtenu est récupéré et est repris dans de l'eau distillée et centrifugé deux fois dans les mêmes conditions.

Le culot des spores est re-suspendu dans une solution de Glycérol à 30%. La suspension des spores obtenue est, alors, traitée à 70°C pendant 15 min puis refroidi dans la glace pendant 5 minutes.

Une observation microscopique à l'aide d'un microscope à contraste de phase (Olympus BX 50 instrument, Rungis, France) lié à un appareil photo a été effectuée afin de vérifier l'aspect des spores obtenues. Enfin, la suspension ainsi traitée est stockée à - 80°C jusqu'à utilisation.

II.3. 5. Identification moléculaire des isolats

Les souches présumées de *Bacillus cereus* ont été identifiées par séquençage d'ADNr 16S suivant les étapes suivantes:Extraction d'ADN bactérien.Suivie de son amplification d'ADN et de sa révélation

II.3. 5.1. Extraction d'ADN bactérien

Une öse de cellules conservées est cultivée dans 5mL de Bouillon nutritif enrichi avec de la peptone et incubée à 37°C pendant 24 heures.

L'ADN bactérien a été extrait suivant la procédure décrite par Sambrook et al. (1989). Les cellules végétatives ont été récoltés après une centrifugation de 5000g pendant 5min à 25°C.Après élimination du surnagent, le culot cellulaire était suspendu dans 200µL de tampon TE, 1X (**Voir composition en annexe 1**) dilué au 1/10^{ème} et homogénéisée à l'aide d'un vortex. Puis on lui ajoute 500µL de la solution de lyse (**Voir composition en annexe 1**) en mélangeant par inversion. Le mélange est porté ensuite au bain Marie à 55°C pendant 30min. Puis, un volume de 700µL de phénol-chloroforme (chloroforme-alcool isoamylique 24V/1V; phénol-chloroforme 1V/1V) est ajouté au lysat. Le mélange est agité jusqu'à l'obtention d'une suspension laiteuse stable puis soumis à une centrifugation à 10000g pendant 15min.

600µL de la phase aqueuse supérieure sont prélevés (en évitant de reprendre le précipité blanc de protéines situé à l'interface),et transvasés dans un nouveau tube Eppendorf stérile auquel on ajoute 200µL d'acétate de sodium3M, pH=5.2 et 400µL d'alcool isopropylique. Le mélange est portéà -20°C pendant 30min puis centrifugé à 10000g pendant 10min pour obtenir le culot d'ADN bactérien. Celui-ci est lavé 2 fois avec 500µL d'éthanol à 70%. Le lavage est effectué en centrifugeant le mélange à 10000g pendant 5minutes. Enfin, le culot de l'ADN bactérien est séché sous hôte puis suspendu dans 200µL d'eau distillée stérile avant d'être conservé à -20°C. Ensuite, la pureté et la concentration (mg/mL) de l'ADN bactérien sont déterminées en se basant sur son spectre d'absorbance. Pour cela, 40µL d'ADN bactérien obtenu précédemment est dilué dans 460µL de l'eau sur un spectrophotomètre d'adsorption moléculaire (UNICAM). L'absorbance de l'ADN bactérien est mesuréeà 200 à 300 nm. Après avoir effectué le calibrage du spectrophotomètre, la courbe de balayage d'absorbance permet de renseigner sur la pureté et la quantité de l'ADN bactérien à la fois. Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} doit être au voisinage de 1,7.

II.3. 5.2. Amplification d'ADNr 16S

Le gène 16S est une région conservée chez toutes les espèces. L'amplification partielle du gène 16S permet d'étudier la phylogénie des souches isolées après séquençage et comparaison de leurs séquences (Petti, 2005). L'amplification partielle de la séquence de gène ADNr 16S a été effectuée par l'utilisation des amorces standard sens 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et amorce standard anti sens 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Paramètres de réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

En se basant sur la concentration de l'ADN extrait, 6 échantillons ont été choisis et ont fait l'objet de la PCR dans un thermocycleur de marque « Techne Flexigene ». Le mélange d'ADN-PCR (Master Mix 50µL) a été mis dans des microtubes. La composition et les volumes de PCR Master mix ont été reportés dans le tableau 7. Ensuite la PCR des échantillons étudiés a été effectuée selon le programme illustré dans le tableau 8.

Tableau 7: Composition et concentration des solutions de PCR Master Mix 50µL.

Composants	Volume	Concentration finale
PCR Master Mix, 2X	25µL	1X
Primer sens 27F (W18), 10µM	5µL	1µM
Primer antisens 1492R (W20), 10µM	5µL	1µM
Echantillon d'ADN	10µL	< 250ng
Nuclease Free Water 10	5µL à 15 µL	N.A.

Tableau 8: Les conditions d'amplification des produits PCR.

Étapes	Temps/cycle	Température
Activation initiale (Hybridation)	1min	52°C
Dénaturation de l'ADN	1min	94°C
Fixation des amorces	1min	52°C
Elongation (polymérisation)	1min	72°C
Nombre de cycles	35 cycles	72°C
Fin de cycles de PCR	10min	10°C

II.3. 5.3. Révélation de produits de PCR sur gel d'agarose à 1%

Les produits de PCR amplifiés sont révélés sur un gel d'agarose à 1% (**voir composition en annexe 1**). Ensuite on procède à la préparation des échantillons pour dépôt (5µL d'échantillon, 2µL de Sybr Gold, 1µL de Tampon de charge). Le gel d'agarose est coulé dans une cuve d'électrophorèse munie d'un peigne à 8 cupules. Après solidification du gel, celui-ci est immergé dans un tampon de migration TAE 1X (Tris-acétate-EDTA 1M); puis sont effectués les dépôts des échantillons, le contrôle et le marqueur de taille (Lamda ADN/EcoR1+Hind III) dans les puits formés sur le gel.

La migration se fait sous tension de 80mV pendant 1h30min. Après migration, le gel est démoulé et mis dans une solution de bromure d'éthidium (0,5µg/mL) pendant 20 minutes. La révélation se fait par visualisation du gel sous la lampe UV d'un transmetteur de la lumière UV relié à un appareil photo.

Séquençage du gène panC

Le séquençage du gène PanC a été effectué dans le laboratoire d'ADRIA développement site de Quimper (France). Pour ce type de séquençage, on procède à une extraction de l'ADN avec le kit Qiagen, PCR avec amorces panC de [Guinebretière \(2010\)](#) (Protocole: 5 min 94°C suivi de 30 cycles 15 sec 94°C/30 sec 55°C/30sec 72°C). Puis séquençage simple brin (BIOFIDAL). Enfin l'alignement des séquences a été réalisé en utilisant l'outil en ligne Symprevius (<https://www.tools.symprevius.org/bcereus/>).

II.3.6. Détermination des valeurs minimales du pH et d'a_w de croissance de *Bacillus cereus*

Pour la détermination du pH minimal de croissance, 6 souches de *B. cereus* ont été retenues en utilisant le Bouillon Nutritif dont le pH a été ajusté par l'ajout de l'HCl (0,1N) ou de NaOH (0,1N). La gamme de pH étudiée allait de 4,51 à 9,35.

La détermination de l'a_w minimale de croissance a été également réalisée dans le bouillon nutritif dont l'a_w a été ajustée par addition de NaCl. Les concentrations sont déterminées en se basant sur les seuils critiques de la croissance de *Bacillus cereus* ainsi que les seuils indiqués par [Morales et al. \(2006\)](#), avec une gamme d'a_w comprise entre 0,940 et 0,982. Une fois le pH et l'a_w ajustés, les milieux sont stérilisés. Ensuite on y inocule dans les mêmes proportions de suspension sporulée à raison de 10µL/5mL du BN par tube. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

Après incubation, le taux de croissance a été vérifié par présence ou absence de trouble. En se basant sur cette observation, on déduit les valeurs de pH min et a_w min.

II.3. 7. Étude de la thermorésistance de spores de *Bacillus cereus*

Les suspensions sporales de *Bacillus cereus* précédemment préparées et conservées à -80°C ont été utilisées pour la réalisation des expériences de traitement thermique. La concentration initiale des suspensions sporales a été déterminée après un ensemencement sur gélose nutritive et incubation à 37°C pendant 24h.

II.3. 7.1. Traitement thermique des spores de *Bacillus cereus*

Pour le traitement thermique quatre spores ont été prises en considération.

Un volume de la suspension sporale (concentration initiale de 10^8 à 10^{10} /mL) était dilué au 1/100ème dans 4mL de bouillon nutritif. Ensuite, 100 µL de la dilution des spores était introduite au centre de capillaires stériles (de 100 µL) puis soudés de deux extrémités à la flamme. Les capillaires sont alors placés sur des portoirs et plongés dans un bain glycérol-eau thermostaté à la température étudiée (100, 105, 110, 115 et 120). Après le traitement, ils sont retirés à des intervalles de temps et refroidis instantanément dans un bain d'eau glacée. Les extrémités de ces tubes étaient rayées à l'aide d'une scie à verre, flambées, puis cassées. Le contenu des tubes était chassé par 1 mL de diluant Tryptone-Sel Eau vers un tube de 9mL de ce même diluant, puis des dilutions décimales étaient réalisées. Enfin, 1mL de chaque dilution était ensemencé en masse sur gélose nutritive puis incubé à 37°C pendant 24 à 72 heures (**Voir figure 11**).

Les survivants sont dénombrés, puis la cinétique de destruction est tracée et les paramètres de thermorésistance ont été estimés.

II.3. 7.2. Étude de l'effet du pH sur la thermorésistance de *Bacillus cereus*

L'effet du pH sur la thermorésistance de *Bacillus cereus* a été étudié suivant la même procédure décrite précédemment mais seulement pour la souche LMBCF002. Cependant, le milieu de traitement était le Bouillon Nutritif dont le pH de départ était ajusté aux différentes valeurs (7, 6.5, 6, 5.5, 5 et 4.5) par du HCl (1N). Le milieu de traitement était stérilisé par filtration sur membrane de (0,22 µm). Après inoculation du bouillon nutritif à pH ajusté avec la souche LMBCF002, des dilutions décimales ont ensuite été réalisées. Enfin, 1 mL de chaque dilution a été ensemencé sur la gélose nutritive à 37 °C pendant 24 à 72 heures.

Le temps de réduction décimale (D) et la sensibilité au traitement (z pH) de spores de *B. cereus* (LMBCF002) ont été estimés par le logiciel GraphPad PRISM version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

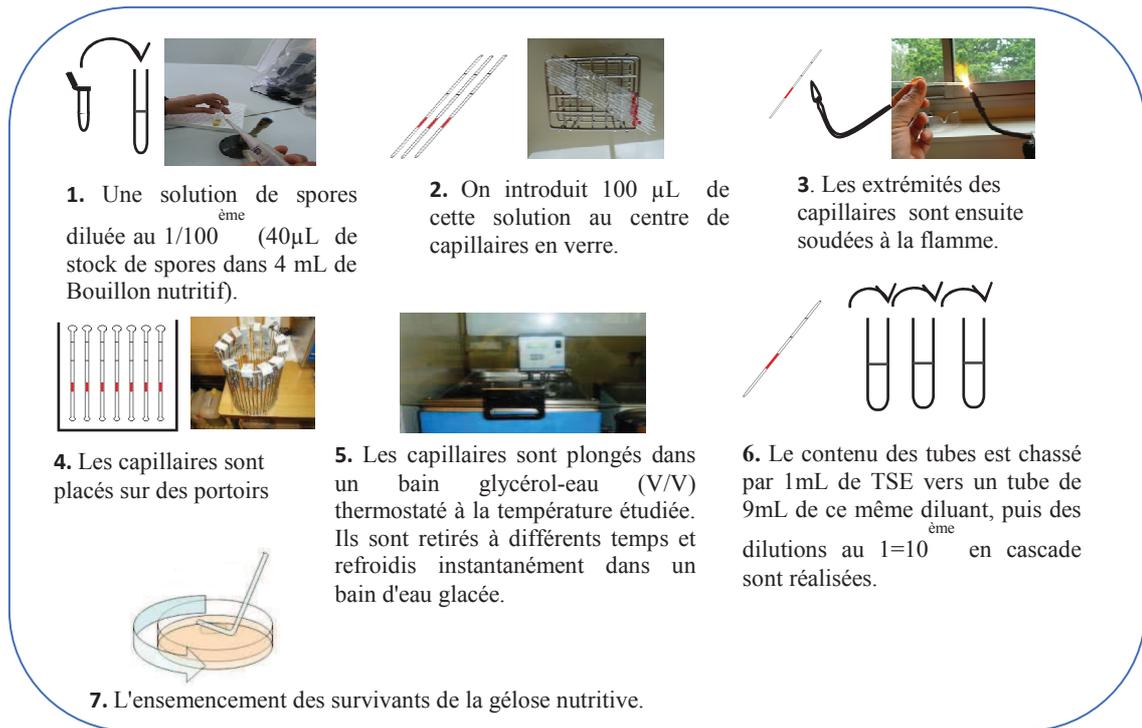


Figure 11: Protocole expérimental utilisé pour l'étude de la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* dans le bouillon nutritif.

II.3.7.3. Détermination de la thermorésistance de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu

La détermination de la thermorésistance de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu a été menée comme suit: 45g de fromage fondu ont étéensemencés par 450µL de suspension de spores (à raison de 1%). Le mélange était homogénéisé à l'aide du Stomacher (Lab-Blender 400). Chaque souche a été utilisée pour l'ensemencement du fromage dont elle a été isolée. Les mélanges sont introduits dans les ampoules de type Wheaton (Sigma Aldrich, France) à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille stérilisée (Spinal Needle quincke Type point 18GA3.00IN, 1,2*75mm). Les ampoules sont soudées à l'extrémité puis traitées à différentes températures (110 et 120°C). Après avoir effectué le traitement, les ampoules ont été retirées à des intervalles de temps et refroidis instantanément dans un bain d'eau glacée (Voir figure 12).

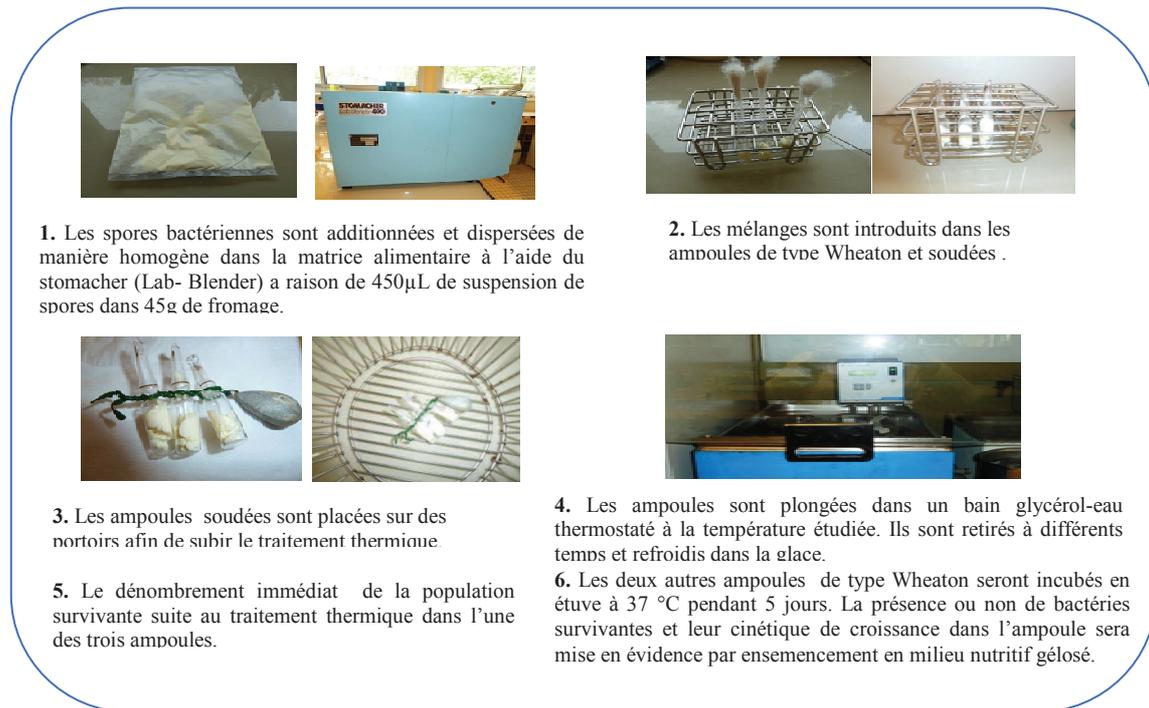


Figure 12: Protocole expérimental utilisé pour l'étude de la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu.

Le mélange de la première série d'ampoules était chassé puis étalé sur la Gélose nutritive et incubé à 37°C pendant 24 heures. Par ailleurs, deux autres ampoules de type Wheaton étaient laissés à l'étuve à 37 °C pendant 5 jours. Après ce temps d'incubation les bactéries survivantes non affectées par les conditions d'incubation se sont développées dans la matrice alimentaire. Le temps de réduction décimale (D) de spores de *B. cereus* dans le fromage fondu a été estimé par le logiciel Graph Pad PRISM V6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

II.3.7.4. Détermination des paramètres de la thermorésistance

Le temps de réduction décimale (D_T) est la durée de traitement à une température donnée permettant de détruire 90% de la population microbienne initiale. La sensibilité au traitement (Z_T) c'est l'augmentation de température induisant une réduction de la durée de traitement D_T d'un facteur de 10 ; Ainsi elle représente l'inverse de la pente obtenue en traçant la valeur $\log D_T$ en fonction de la température exprimée en °C.

La courbe $D=f(T)$ est appelée courbe de survie. Les valeurs D_T et Z_T de spores de *Bacillus cereus* isolées de nos fromages ont été estimées par GraphPad PRISM version 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). La valeur de la pente inverse.

II.3. 8. Détection de toxines de souches de spores de *Bacillus cereus*

La détection des toxines a été réalisée au CNRST de Rabat (Maroc). Elle a concerné quatre souches de *Bacillus cereus* groupe III identifiées auparavant.

Pour ce faire une extraction d'ADN a été réalisée, l'ADN extrait a été dosé par le Nanodrop 8000, La PCR a été réalisée en utilisant les amorces CES F1/R2, NA2/NB1 et HD2/HA4 pour obtenir respectivement les amplicons de taille: 1271bp, 766bp et 1091bp. Le protocole de la PCR est le suivant :95°C, 1min suivi de 35 cycles (95°C/15sec; Th/20sec; 72°C/15sec); 72°C, 3min. Sachant que la température d'hybridation de chaque paire d'amorce est : CES F1/CES R2: 57°C, NA2 F/NB1 R: 45°C, HD2 F/ HA4 R : 44°C avec un thermocycleur de marque Verity d'ABI.

Une électrophorèse a été effectuée pour les produits PCR par migration de ce dernier sur un gel d'agarose à 1,5% en présence des marqueurs de poids moléculaire 1kb et 100bp. Enfin des photos visualisées par le système de photo documentation « G Box ».

Les toxines recherchées par cette technique sont: L'entérotoxine HBL (hblD et hblA), l'entérotoxine Nhe (NheA et NheB) et la cereulide seulement. Ceci est dû au coût élevé de cette analyse (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Les amorces oligonucléotidiques utilisées dans cette étude (Ehling-Schulz *et al.*, 2005 ; 2006).

Amorces	Gène	Fragment amplifié	Séquences5'-3'
CesF1 CesR2	Ces	1271	GGTGACACATTATCATATAAGGTG GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA
NA2 F NB1 R	Nhe A et nheB	766	AAG CIG CTC TTC GIA TTC ITI GTT GAA ATA AGC TGT GG
HD2 F HA4 R	Hbl D et hbl A	1091	GTA AAT TAI GAT GAI CAA TTTC AGA ATA GGC ATT CAT AGA TT

Ces, Cereulide synthétase; NA2, Composante d'entérotoxine A non hémolytique; NB1, Composante d'entérotoxine B non hémolytique; HD2, Composante d'entérotoxine D hémolytique; HA4, Composant hémolytique d'entérotoxine A., F, amorce sens; R, amorce antisens.

II.4. Analyse statistique

Pour confirmer nos résultats obtenus des analyses statistiques ont été réalisés. Une matrice de corrélation a été calculée pour vérifier la dépendance maximale entre les couples des paramètres étudiées, avec Excel XLSTAT version 2010.6.017.5.2.

Ainsi une étude statistique multidirectionnelle, l'analyse en composantes principales (ACP), afin de visualiser les groupements possibles en se basant sur tous les paramètres physicochimiques et bactériologiques étudiés. Pour ceci le XLSTAT version 2010.6.017.5.2 a été utilisé.

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric rings of different shades of blue. These circles are positioned in the top right, center, and bottom right areas. A thin blue line runs diagonally from the top left towards the center, and another thin blue line runs diagonally from the top right towards the bottom right.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

III. 1. Résultats des analyses physicochimiques des fromages

La qualité bactériologique d'un produit alimentaire est généralement liée à ses propriétés physico-chimiques.

Les résultats des analyses physicochimiques des fromages fondus étudiés sont mentionnés dans le tableau 10.

III. 1. 1. Extrait sec total (EST)

Les valeurs de l'EST des fromages fondus analysés varient de $34,04 \pm 0,86$ % pour le fromage F à $48,33 \pm 0,90$ % pour le fromage A avec une valeur moyenne de 40,12%. Le fromage témoin (G) a un EST de $41,59 \pm 0,96$ % (Voir figure 13 et tableau 10).

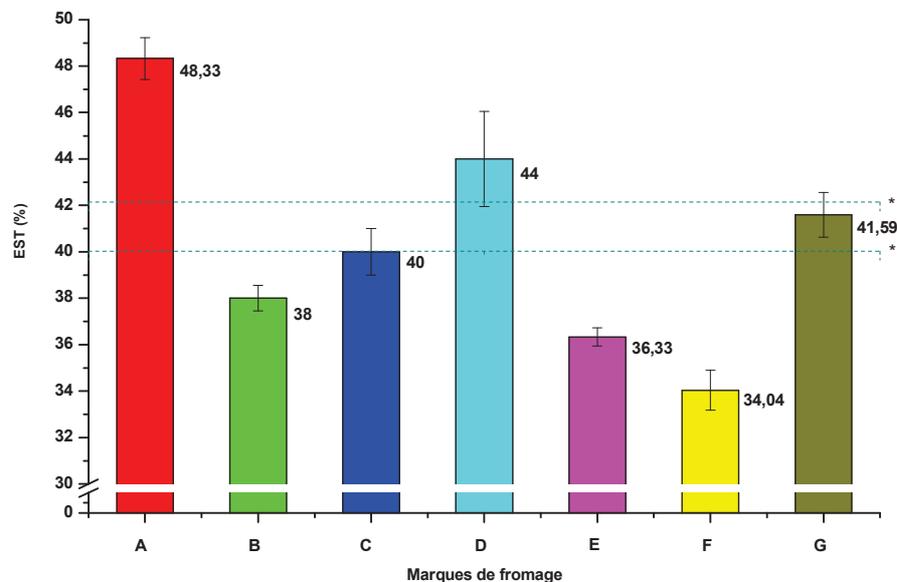


Figure 13: Taux d'extrait sec total EST des différents fromages fondus étudiés.

(*: Limites optimales selon [Roustel et Boutonnier, 2015](#)).

La valeur moyenne obtenue dans notre travail concorde avec les valeurs obtenus par [Roustel et Boutonnier \(2015\)](#) dans le cadre de contrôle qualité des fromages fondu qui varient pour les fromages fondus en portions de 40 à 42%.

Tableau 10 : Caractérisation physicochimique des fromages fondus étudiés.

Marques de fromages Paramètres	A	B	C	D	E	F	Valeur moyenne des six fromages	G (Témoin)	Valeurs de références
	n=3	n=3							
Extrait sec total : EST (%)	48,33±0,90	38±0,55	40±1	44±2,05	36,32±0,39	34,04±0,86	40,12	41,59±0,96	40-42 ¹
Matière grasse : MG (%)*	22,23±0,38	11,4±0,7	12±0,55	18,04±1,35	17±0,72	11,5±0,70	15,36	20±2,12	21-22 ²
Rapport : G/S (%)*	46± 1,87	30±1,80	30±1	41±1	47±1	34±1	38,00	48±1	50-55 ¹
Taux de protéines (%)*	11,39±0,52	11,22±1,07	11,39±0,72	11,29±0,74	10,83 0,83	11,50±0,50	11,27	11,25±0,59	10-17 ²
Taux de cendres (%)*	2,60±0,26	3±0,1	3,40±0,36	4±1	3±0,33	3,5±0,40	3,25	3,13±0,27	2-3 ²
Acide lactique (mg/100g) **	151±0,002	95±0,006	211±0,004	294±0,005	225±0,008	181±0,005	193	153±0,004	<0,3 ³
pH	5,750±0,005	5,84±0,01	6,16±0,02	5,74±0,01	5,86±0,01	5,71±0,01	5,84	5,16±0,02	5,50 - 5,55 ¹
Activité d'eau (a _w)	0,978±0,005	0,980±0,004	0,975±0,004	0,965±0,002	0,981±0,010	0,971±0,020	0,975	0,974±0,001	0,840 <a _w < 0,940 ⁴

* : % en matière sèche

** : g d'élément déterminé/ 100g de fromage

¹Roussel et Boutonnier (2015).

²Richonnet (2016)

³Arthur et Prashanti (2013).

⁴A.C.I.A (2014).

Par ailleurs la valeur moyenne obtenue est inférieure à certaines valeurs citées par la littérature : [Favier et al. \(1986\)](#) dans le cadre d'une étude sur la composition du lait et des produits laitiers, ont rapporté des teneurs variant de 34 à 37% pour les fromages fondus à 25% de taux G/S et des teneurs variant de 43 à 57 % pour les fromages fondus à 40-50 % de taux G/S.

Ainsi [Vierling \(2003\)](#) dans le cadre d'une étude sur la qualité nutritionnelle du fromage, rapporte des valeurs de 35, 48 et 52% pour les fromages fondus à 25, 45 et 60 % de taux G/S respectivement.

Le [Codex alimentaire \(1978\)](#) préconise un taux d'EST qui varie de 34 à 53% pour le fromage fondu en bloc et de 29 à 45% pour le fromage fondu pour tartine. Ces variations sont dues essentiellement au taux des matières grasses. Par ailleurs, le taux Gras sur sec augmente généralement avec le taux de l'extrait sec total.

D'après le Centre [Canadien d'Information Laitière \(C.C.I.L., 2005\)](#), la réglementation canadienne fixe un taux d'extrait sec total de 50% . [Richonnet \(2016\)](#) rapporte un taux similaire dans le cadre d'une étude des caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus.

Le taux d'extrait sec dans un fromage fondu dépend entre-autre de la quantité de fromage utilisé pour la fonte et du taux d'extrait sec des autres matières premières mises en œuvre pour la fabrication du fromage fondu ([Eck et Gillis, 1997](#)). Un taux d'EST faible facilite le processus d'échange d'ions et conduit à une augmentation du coefficient de «peptisation». En effet, plus les caséines sont hydratées, plus leur structure est lâche, ce qui permet aux sels de fonte de pénétrer plus facilement les molécules des caséines et d'améliorer la «peptisation» ([Dimitreli et Thomareis, 2005](#)). Cette propriété qui est également dépendante de la minéralisation des fromages est exploitée pour avoir des fromages fondus tartinables

III. 1.2. Teneur en Matières grasses (MG) et rapport G/S

La teneur en matières grasses des fromages fondus analysés varie entre $11,4 \pm 0,7\%$ pour le fromage « B » et $22,23 \pm 0,38\%$ pour le fromage « A » avec une moyenne de 15,36%. Cette valeur moyenne des six marques de fromages est inférieure à celle du fromage de référence « G » qui est de $20 \pm 2,12\%$ (**Voir figure 14A et tableau 10**).

Ces teneurs restent légèrement inférieures de celles indiquées par [Richonnet \(2016\)](#) qui varient de 21 à 22% de fromage fondu et de la valeur rapportée par [Fox et al. \(2017b\)](#) qui est de 23,3% pour les fromages fondus en bloc. Aussi, [Oliveira et al. \(2016\)](#) rapportent une

teneur égale ou supérieure à 30% de matière grasse pour les fromages fondus (PC) et une teneur égale ou supérieure à 23% pour les fromages fondus pour aliments (PCF).

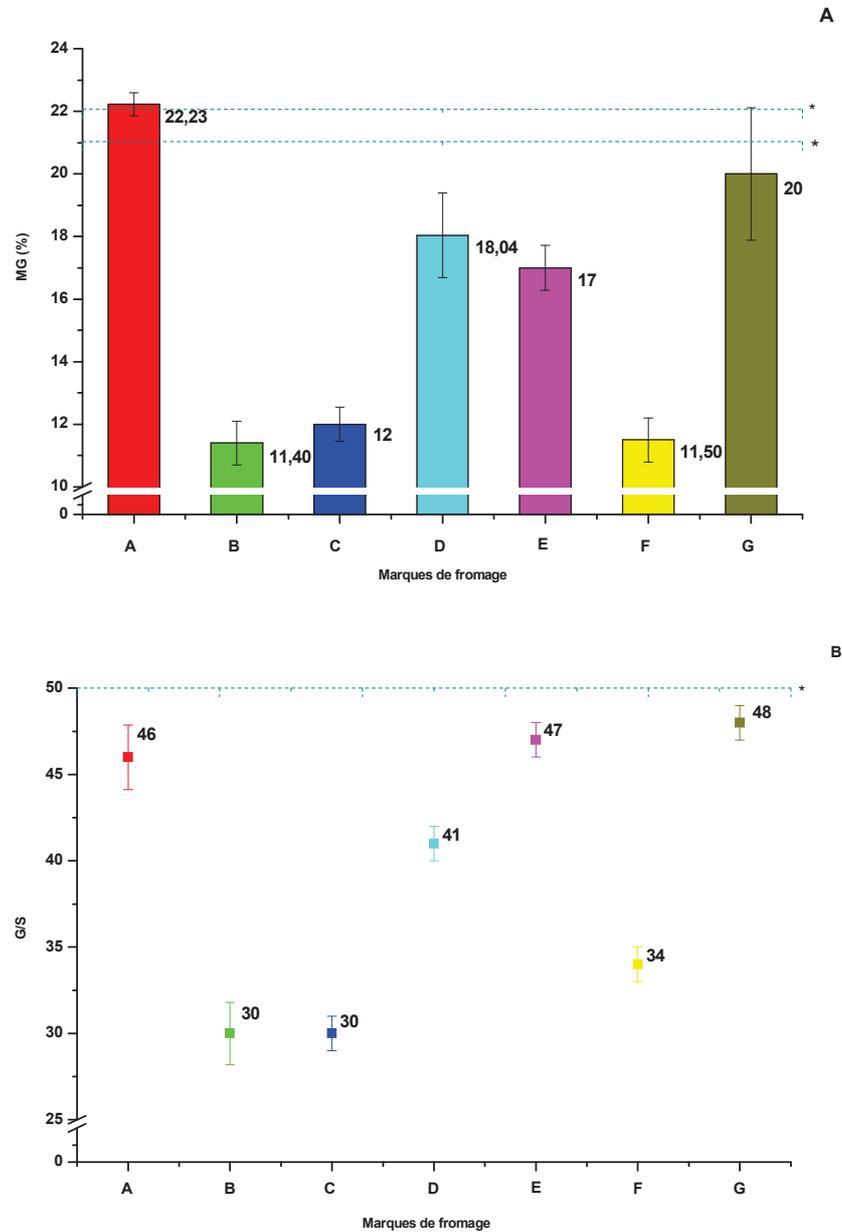


Figure 14: Teneur en matière grasse: MG (A) et rapport G/S (B) des différents fromages fondus étudiés

*(A): Limites optimales selon [Richonnet, 2016](#))

*(B): Limites optimales selon [Roustel et Boutonnier, 2015](#)).

La source de matière grasse présente dans le fromage fondu est principalement le fromage utilisé comme ingrédient principal (environ 90%) ([Bachmann, 2001](#)). Cependant,

d'autres ingrédients laitiers, tels que la crème et la matière grasse laitière anhydre contribuent également à la teneur finale en matières grasses du produit (Tamime *et al.*, 1999).

La différence en matière grasse des fromages analysés est probablement due à la différence de la teneur en matière grasse des matières premières utilisées et à la différence dans les formulations des fromages fondus en question (Kumar, 2012; Hauerlandová *et al.*, 2014).

Les traitements thermiques, les sels de fonte et l'agitation qui engendre une réduction de la taille des globules gras contribuent à l'homogénéisation et à l'émulsification de la matière grasse, (Lelievre *et al.*, 1990; Tamime *et al.*, 1990).

Les faibles teneurs en matière grasse d'origine laitière peuvent être compensées dans des fromages fondus qu'on trouve sur le marché par de la matière grasse d'origine végétale. Le rôle des matières grasses peut également être substitué par l'apport de produits comme les gommes et les stabilisants (Tamime, 2011). Ceci est confirmé par les travaux de Ferrão *et al.* (2016), qui rapportent que les ingrédients tels que des composés protéiques (lait et oeufs), des glucides (gommes, dextrans, maltodextrines, cellulose, polydextrose, inuline et amidons) et des graisses synthétiques (malonate de dialkyl dihexadécyle et polyester de saccharose) peuvent être utilisés seuls ou en combinaison pour produire les fromages à faible taux en gras. Les amidons modifiés sont également des substituts de graisse utilisés en industrie alimentaire pour fournir des caractéristiques souhaitables aux produits finaux (Diamantino et Penna, 2011). Pour être conformes à la réglementation, ces produits sont dits spécialités fromagères et non fromages fondus

La qualité du fromage fondu, comme tout aliment, est directement liée aux attributs sensoriels tels que l'apparence, la texture et la saveur, qui doivent être en harmonie pour que le produit final soit bien apprécié (Foegeding *et al.*, 2010). L'un des principaux problèmes découlant de la réduction de la teneur en matière grasse dans le fromage est le développement d'une texture moins onctueuse, compromettant la mastication. Le comportement inverse est observé pour les fromages riches en matières grasses (Rogers *et al.*, 2010). La détermination de la matière grasse et l'extrait sec total, permet d'évaluer le rapport G/S. Dans notre cas, les résultats indiquent un rapport moyen de G/S de 38% avec une valeur minimale de $30 \pm 1\%$ pour les fromages « B » et « C » et une valeur maximale de $47 \pm 1\%$ pour le fromage « E », tandis que l'échantillon de référence « G » a donné un rapport G/S de $48 \pm 1\%$ (Voir figure 14B et tableau 10).

Les résultats du ratio G/S que nous avons obtenus sont faibles par rapport à ceux obtenus par [Roustel et Boutonnier \(2015\)](#) qui, dans le cadre de contrôle qualité des fromages fondus ont trouvé des ratios variant de 50 à 55%. Nos résultats sont également plus faibles que ceux trouvés par [Boutonnier \(2000\)](#) qui rapporte un ratio de 40%.

Le Codex alimentaire (1978) préconise un taux de G/S variant de 10 à 65% pour les fromages fondus pour tartine et les fromages fondu en bloc

Le rapport (G/S) dépend essentiellement du taux de matières grasses ajoutées au mélange. En absence d'une norme algérienne, les services du CACQE, évaluent ce paramètre et l'interprètent uniquement par rapport à la déclaration du fabricant sur l'étiquetage du produit. Cette évaluation a pour seul but de vérifier la conformité du produit au taux donné par son étiquetage.

III. 1.3. Taux de protéines

Les résultats obtenus varient de $10,83 \pm 0,83\%$ pour l'échantillon « E » et $11,50 \pm 0,50\%$ pour l'échantillon « F » avec une valeur moyenne de $11,27\%$ pour les six échantillons alors que le fromage de référence avait un taux de protéines de $11,25 \pm 0,59\%$ (Voir **tableau 10**, **figure 15**).

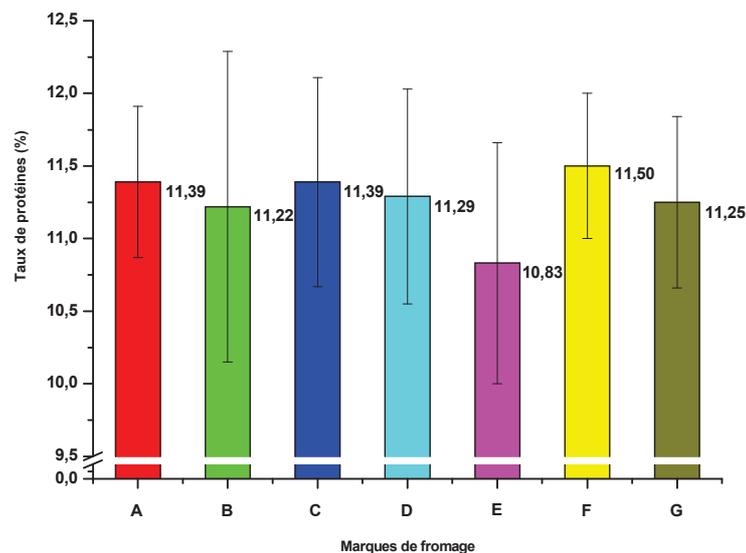


Figure 15: Taux de protéines des différents fromages fondus étudiés

Les taux de protéines que nous avons obtenus concordent avec ceux obtenus par [Richonnet \(2016\)](#) qui, en se basant sur les rapports de [l'ANSES \(2013\)](#) et de [l'USDA](#)

(2014), rapporte un taux de 10% pour des fromages fondus fabriqués en France, par contre, les taux de protéines que nous avons obtenus restent plus faibles que le taux de 17% rapporté par le même auteur pour des fromages fondus fabriqués aux USA.

Nos résultats sont également plus faibles que le taux de 18% rapporté par Eck et Gillis (1997) et ceux obtenus par Mounsey et O'riordan (2008) qui, dans le cadre d'une étude des fromages contenant des amidons de riz natifs ou modifiés, ont constaté des taux de 17%. Ces mêmes auteurs ont trouvé un taux de protéines de 20,27% dans les fromages sans amidon ajouté.

Fox *et al.* (2017a) rapportent eux un taux de 18,3% pour des fromages fondus en bloc.

Selon leur mode de fabrication, les fromages contiennent de 10 à 30% de protéines qui proviennent essentiellement du fromage utilisé comme matière première. Le taux de protéines du fromage fondu élaboré à partir de pâte pressée est de 14 à 20 % alors que le taux de protéines du fromage fondu élaboré à partir d'une pâte lactique est de 9 à 11% (Ramet, 1985).

Les protéines jouent un rôle majeur dans la texture des fromages car elles constituent la seule phase solide continue. Toute diminution du taux des protéines dans le fromage fondu aura une répercussion sur ses propriétés rhéologiques. (Kfoury *et al.*, 1989), d'autres part, les protéines, les matières grasses et l'eau du fromage fondu peuvent interagir avec les arômes et les autres molécules sapides et ainsi modifier la perception de sa qualité sensorielle (Lauverjat *et al.*, 2009; Boisard, 2012).

III. 1. 4. Taux de cendres

Les résultats que nous avons obtenus varient entre $2,60 \pm 0,26\%$ pour le fromage « A » et $4 \pm 1\%$ pour le fromage « D », avec une valeur moyenne de 3,25%, alors que le taux des cendres de l'échantillon de référence a été de $3,13 \pm 0,27\%$ (**Voir tableau 10 et figure 16**).

Les sels minéraux du fromage fondu sont constitués des sels de fonte ajoutés au cours de la fabrication et des sels contenus dans le fromage matière première (Varunsatian *et al.* 1983). A titre d'exemple les fromages type Cheddar -l'une des matières premières les plus utilisées- faits à partir de laits enrichis en protéines contiennent plus de minéraux, et indirectement, plus de cendres (Guinee *et al.*, 2006).

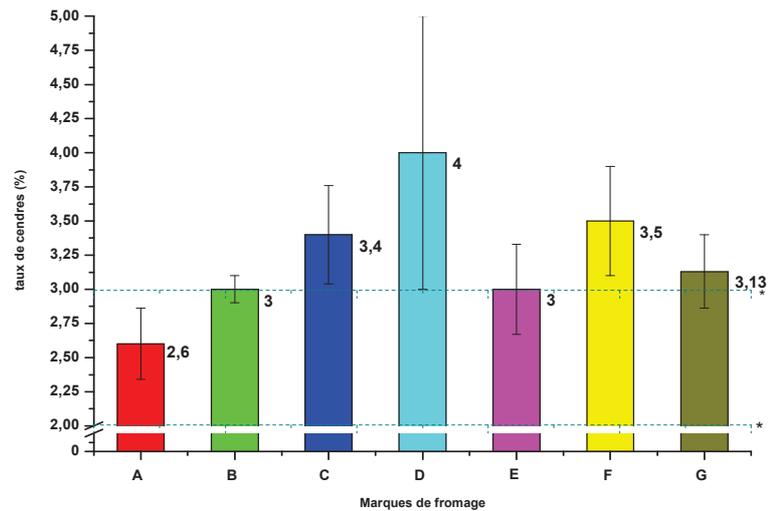


Figure16: Taux des cendres dans les fromages fondus étudiés
(*: teneur optimale selon [Richonnet, 2016](#)).

[Eck et Gillis \(1997\)](#), rapportent que le taux maximal de sels de fonte autorisé dans la formulation des fromages fondus est de l'ordre de 3%, par contre, le règlement CE n° 1333/2008 fixe à 2% (exprimé en P_2O_5) la quantité maximale de sels de fonte pouvant être utilisée lors de la fabrication des fromages fondus. selon les rapports de [ANSES \(2013\)](#) et [USDA \(2014\)](#), [Richonnet \(2016\)](#) cite le taux de 2 % pour les fromages fondus fabriqués en France et 3% pour les fromages fondus fabriqués aux USA.

[Esteban et Marcos, \(1989\)](#) rapportent des taux de cendres de 4,2% pour des fromages fondus a faible taux en gras, 4,7% pour des fromages fondus, mi-gras, gras et extra-gras et 2,1% pour un fromage fondu double gras

Dans le cadre d'une étude sur l'effet de poudre de Konjac (poudre riche en glucomannanes servant de coupe-faim) sur les propriétés des fromages fondus à faible teneur en matière grasse, [da Silva et al., \(2016\)](#), ont obtenu des résultats montrant que le taux de cendres de l'échantillon témoin sans poudre de Konjac qui était de 2,4% a augmenté à 3,4% pour l'échantillon additionné de poudre de Konjac

La concentration et le type de sels de fonte utilisés affectent les propriétés fonctionnelles et sensorielles des fromages fondus : En effet, les sels de fonte interviennent dans la solubilisation des protéines, dans la séquestration du calcium, dans la régulation du pH et ont une fonction antimicrobienne ([Roustel, 2014](#); [Fox et al., 2017b](#)).

Un excès de sels de fonte donne une texture instable, une consistance trop ferme et un goût salin ainsi que des problèmes de cristallisation ([Eck et Gillis, 1997](#)). À l'inverse, un sous-dosage des sels de fonte conduira à une pâte épaisse, une consistance non homogène et

une exsudation de sérum dans le produit fini (Roustel, 2014).

En considérant, le type de sels de fonte, on constate que les polyphosphates produisent des fromages fondus ayant une bonne structure et confèrent aux produits finis une plus grande aptitude à la conservation du fait de leur capacité élevée à séquestrer le calcium (Boisard, 2012). Les pyrophosphates -plus particulièrement les orthophosphates- ont tendance à induire des défauts sensoriels dans le produit fini (Fox *et al.*, 2017a). Les citrates, quant à eux, sont efficaces comme émulsifiants au même titre que les polyphosphates mais ne possèdent pas d'effets bactériostatiques (Oliveira *et al.*, 2016). L'effet sur le crémage est faible dans le cas des orthophosphates, et très fort dans le cas des polyphosphates.

Par ailleurs, la capacité de peptisation augmente avec la polymérisation des polyphosphates qui conduisent à une meilleure dispersion de la caséine en comparaison avec le citrate trisodique et le phosphate disodique (Roustel, 2014, Roustel et Boutonnier, 2015).

En général, la quantité de sels de fonte à mettre en œuvre se calcule par rapport à la matière première à fondre, et plus précisément par rapport à sa teneur en caséine intacte (Oliveira *et al.*, 2016; Fox *et al.*, 2017b). La réduction des sels dans le fromage fondu représente un enjeu quant aux aspects liés à leur rôle fonctionnel d'une part et aux aspects nutritionnels et sanitaires d'autre part (Felicio *et al.*, 2013).

III. 1. 5. Teneur en acide lactique

Des résultats de la détermination de la teneur en acide lactique des fromages étudiés, il apparaît que les concentrations en acide lactique dans les fromages fondus étudiés sont réduites. Celles-ci varient de $95 \pm 0,006$ mg/100g pour le fromage « B » à $294 \pm 0,005$ mg/100g pour le fromage « D », avec une valeur moyenne de 193 mg/100g. Pour le fromage « G » considéré comme référence, cette concentration est de $153 \pm 0,004$ mg/100g (**Voir tableau 10, figure 17**).

Cette faible teneur en acide lactique peut être expliquée par la nature des fromages utilisés comme matière premières qui sont généralement des fromages à pâte pressée et longuement affinés (Henning *et al.*, 2006).

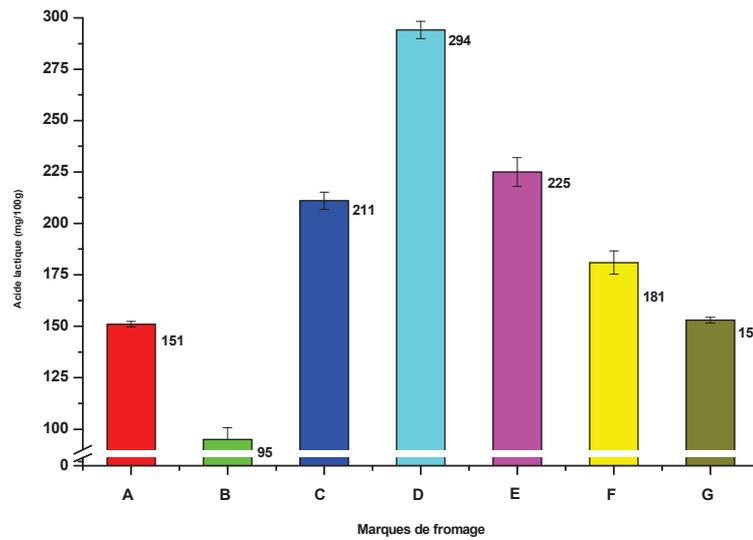


Figure 17: Teneur en acide lactique des différents fromages fondus étudiés.

III. 1. 6. Le pH

D'après les résultats obtenus, on constate que la valeur moyenne du pH des six marques de fromage est de 5,84 avec des valeurs variant de $5,71 \pm 0,01$ « fromage F » à $6,16 \pm 0,02$ « fromage C ». Le pH du fromage de référence « G » est de $5,16 \pm 0,02$ (Voir tableau 10, figure 18).

En comparaison avec les valeurs rapportées par Eck et Gillis (1997), et Roustel et Boutonnier (2015) qui sont de l'ordre de 5,3 à 5,8 et de 5,50 à 5,55 respectivement, on constate que les valeurs obtenues dans notre travail sont légèrement supérieures. Ces valeurs sont également supérieures à celles indiquées par l'agence canadienne de l'inspection des aliments (A.C.I.A, 2014), qui exige que le pH des fromages fondus ne doit pas dépasser 5,6.

Le pH des fromages fondus est un paramètre important car il agit d'une part sur la dissociation des différents groupes à liaison calcium donc sur l'action des sels de fonte et d'autre part sur la solubilité des protéines (Boutonnier, 2000). Il intervient aussi de manière significative sur la qualité de la microstructure et les interactions protéiques dans les fromages fondus.

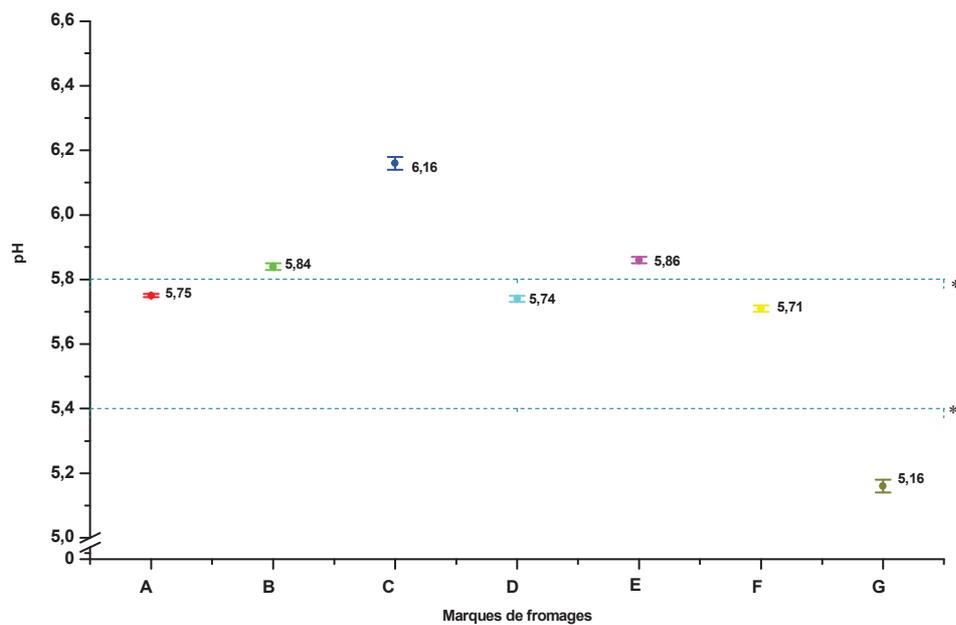


Figure 18 : Valeurs de pH des différents fromages fondus étudiés
(*: Limites optimales selon [Roustel, 2014](#))

Le pH de la pâte dépend des ingrédients qui la constituent et il est rare que celui-ci convienne aux objectifs de pH recherchés pour le produit fini. Il faut donc le réguler pendant le procès en utilisant des régulateurs de pH, généralement des citrates ([Sołowiej et al., 2016](#)). L'incidence du pH sur la texture des fromages fondus est exprimée par les caractéristiques de la pâte du fromage. Un pH de 5,90 à 6,20 donne une pâte liée, trop humide, collante, au goût légèrement savonneux, avec une faible aptitude à la conservation alors qu'un pH de 5,70 à 5,90 donne une pâte homogène, courte, onctueuse, facilement tartinable ([Boutonnier, 2000](#)). Cette gamme de pH comprend les valeurs obtenues dans ce travail. Globalement, les meilleurs résultats sont obtenus pour une gamme de pH comprise entre 5,4 et 5,8, pour les fromages de type tartinable et bloc ([Roustel, 2014](#)).

III. 1. 7. Activité d'eau (a_w)

Les résultats de l'activité d'eau (a_w) des fromages fondus étudiés, montrent que la valeur moyenne des six fromages est de 0,975 avec une valeur minimale déterminée pour le fromage « D » égale à $0,965 \pm 0,002$ et une valeur maximale de $0,981 \pm 0,010$ pour l'échantillon « E », alors que l'échantillon de référence a une activité d'eau de $0,974 \pm 0,001$

(Voir tableau 10, figure 19).

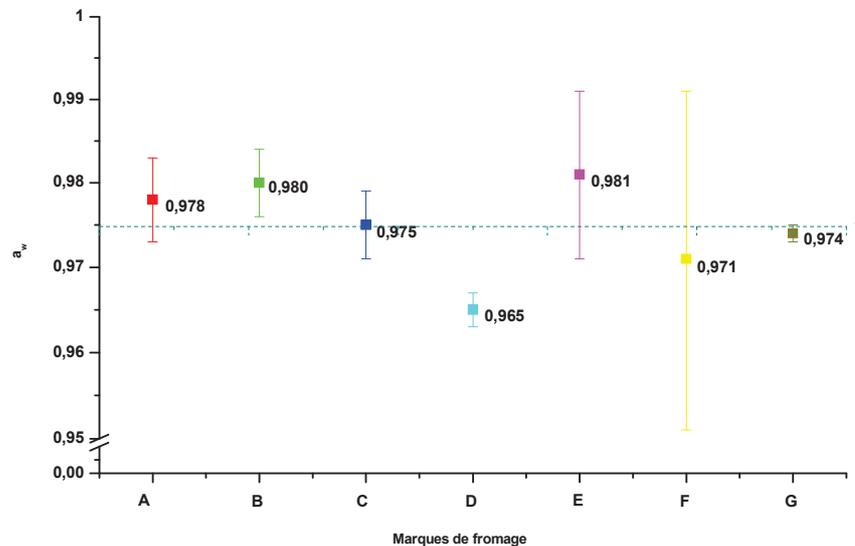


Figure 19: Valeurs mesurées de a_w obtenues des différents fromages fondus étudiés
(*: valeur déterminée par [Fox et al., 2017a](#))

Ces valeurs sont supérieures à celles rapportées par [Rüegg et al. \(1977\)](#) qui indiquent des valeurs de a_w supérieures à 0,970, et par l'agence canadienne d'inspection des aliments ([A.C.I.A., 2014](#)) qui préconise un seuil d' a_w compris entre 0,840 et 0,940 alors que [Fox et al. \(2017a\)](#) déterminent une valeur de 0,975.

L' a_w minimale est importante pour la sécurité des fromages. En effet, la valeur de l' a_w induisant la sporulation bactérienne est inférieure à celle permettant la croissance végétative. Pour *Bacillus cereus* celle-ci est estimée à 0,950 ([Lozach, 2001](#)).

[Jeantet et al., \(2011\)](#) estiment que plus l' a_w de l'aliment est faible, plus les microorganismes sont thermorésistants et donc plus le traitement par la chaleur est inefficace sur les spores. L'activité de l'eau des fromages est abaissée par l'opération du salage. Cet abaissement de l' a_w constitue un levier important de sélection des microorganismes et par la suite, des différentes flores pendant la fabrication et la conservation. Ce phénomène ne se limite pas à une protection sanitaire vis-à-vis des microorganismes pathogènes ou d'altération, il concerne aussi les microflore d'intérêt technologique: bactéries lactiques, bactéries propioniques, microflore bactérienne et fongique de surface ([PNNS/PNA, 2013](#)).

III. 1. 8. Détection de produits amylacés dans les fromages

En ce qui concerne la mise en évidence de produits amylacés dans les fromages fondus étudiés, les résultats obtenus montrent leur présence dans quatre marques parmi les sept étudiées : « A », « B », « C » et « F », bien que parmi ces marques, certaines ne mentionnent pas sa présence sur la liste des ingrédients portées sur l'étiquette du produit. L'utilisation des amidons modifiés comme substituts de graisse, comme adjuvants de texture, stabilisants, émulsifiants et épaississants est réglementée encore faut-il le mentionner sur l'étiquette du produit (Abbas *et al.*, 2010; Colak, 2014). Dans ce cas, l'appellation fromage fondu ne peut pas être utilisée. Le produit peut être appelé analogue, succédané, spécialité ou préparation fromagère.

L'utilisation des amidons permet d'avoir des produits bon marché ayant des propriétés fonctionnelles proches des fromages fondus. Cela nécessite des essais préliminaires utilisant des paramètres tels que la vitesse d'homogénéisation du mélange, le barème du traitement thermique, la mesure des propriétés rhéologiques) et fonctionnelles (fusion, brunissement, rétention d'huile) du produit final ainsi que des tests sensoriels (Snrech Tortelier, 2006).

L'association entre les protéines du lait et l'amidon peut conduire à de nombreuses interactions qui affectent les caractéristiques physico-chimiques des produits finis. La compréhension de ces phénomènes permet d'obtenir des produits de qualité sensorielle acceptable, notamment en ce qui concerne la consistance (Considini *et al.*, 2011).

III. 2. Résultats et discussion des analyses bactériologiques

III. 2.1.. Résultats de dénombrement de la flore totale et de *B. cereus* dans les fromages fondus étudiés

Un dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et de *Bacillus cereus* a été effectué afin de vérifier, d'une part, la charge microbienne totale des fromages qui renseigne sur l'hygiène des process et d'autre part, la proportion de la flore thermorésistante dans cette flore globale. Les résultats des analyses bactériologiques des fromages sont donnés dans le **tableau 11**.

Les taux moyens obtenus pour les six marques varient entre 9×10^3 UFC/g pour la marque « F » et $2,9 \times 10^4$ UFC/g pour la marque « C ». L'échantillon le plus contaminé « C » avait une charge de $3,6 \times 10^4$ UFC/g et le moins contaminé « F » avait quant à lui une charge de 5×10^3 UFC/g. La valeur moyenne obtenue pour le fromage témoin a été de 10^3 UFC/g.

Tableau 11: Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et de *Bacillus cereus* pour les sept marques de fromage fondu étudiés.

Marques de fromages		« A »	« B »	« C »	« D »	« E »	« F »	« G » (Témoin)
Germes recherchés		n=15						
FMAT (UFC/g)	Min	1,0x10 ⁴	1,9x10 ⁴	2,3x10 ⁴	8x10 ³	1,3x10 ⁴	5x10 ³	3x10 ²
	Moy	1,7x10 ⁴	2,1x10 ⁴	2,9x10 ⁴	1,2x10 ⁴	2,2x10 ⁴	9x10 ³	1x10 ³
	Max	2x10 ⁴	2,8x10 ⁴	3,6x10 ⁴	1,9x10 ⁴	2,5x10 ⁴	10x10 ³	1,2x10 ³
<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	Min	9x10 ²	1,5x10 ⁴	1,9x10 ⁴	1x10 ³	1,1x10 ⁴	1x10 ³	< 50
	Moy	1,2x10 ³	1,9x10 ⁴	2,7x10 ⁴	1,6x10 ³	1,8x10 ⁴	1,4x10 ³	< 50
	Max	1,4x10 ³	2,5x10 ⁴	3,4x10 ⁴	1,9x10 ³	2,1x10 ⁴	1,7x10 ²	< 50

Ces résultats obtenus sont supérieurs à ceux rapportés par [Lazárková et al. \(2010\)](#) qui, en analysant 25 échantillons de fromages fondus, ont trouvé qu'ils étaient contaminés avec un taux de 10⁴ UFC/g. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'application de différents modes de stérilisation et de leur effet sur la qualité de fromages fondus en conserve. Une autre étude sur les sources potentielles de bactéries aérobies et anaérobies sporulées dans le fromage fondu menée par [Sadek et al. \(2015\)](#) sur 150 échantillons de fromages fondus (70 en portions et 80 blocs), ont trouvé un taux de 5,6x10² UFC/g dans les fromages fondus en bloc et 4,5x10² UFC/g pour les fromages en portions.

Par ailleurs, des résultats obtenus par [Nazem et al. \(2010\)](#) montrent que la marque la plus contaminée avait un taux moyen de contamination estimé à 6,86x10² UFC/g.

Dans son annexe 1, l'arrêté interministériel du 24 janvier 1998 (JORADP N°35 du 27-05-1998) relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires ne cite pas les fromages fondus. Une instruction interne du ministère du commerce considère les fromages fondus avec les fromages à pâte molle. Pour cette dernière catégorie de fromages, l'arrêté stipule les critères suivants : coliformes totaux, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium sulfito-réducteurs*, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*. Ni les germes totaux ni *Bacillus cereus* ne sont cités dans cet arrêté.

Le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale permet d'évaluer le degré du respect des règles d'hygiène lors de l'élaboration des produits. La rupture de la chaîne de froid et la non maîtrise de liaison chaude peuvent également être l'origine de prolifération ou

survie des micro-organismes (Bachtarzi *et al.*, 2005; Fox *et al.*, 2017c). Le nombre des germes totaux diminue avec l'importance du traitement thermique appliqué mais dépend aussi de la durée et des conditions de conservation.

Ainsi, les taux élevés de contamination dans les fromages fondus que nous avons analysés peuvent être donc associés à des ingrédients de mauvaise qualité, des équipements insalubres ainsi qu'à une hygiène personnelle insuffisante. Cependant Eck et Gillis, (1997) notent que les fromages fondus restent des aliments à forte concentration en micro-organismes.

Concernant le dénombrement de *Bacillus cereus*, les résultats obtenus montrent que les six marques étudiées sont contaminées par *Bacillus cereus sensu lato* avec une concentration moyenne allant de $1,2 \times 10^3$ UFC/g pour le fromage « A » à $2,7 \times 10^4$ UFC/g pour le fromage « C ». L'échantillon le plus contaminé avait une charge de $3,4 \times 10^4$ UFC/g « échantillon de la marque C » et l'échantillon le moins contaminé avait quant à lui une charge de 9×10^2 UFC/g « échantillon de la marque A ». Le fromage témoin « G » confirme sa bonne notoriété avec un plus faible taux de contamination par B. (< 50 UFC/g) (Voir tableau 11 ci-dessus).

Ces taux de *Bacillus cereus* obtenus semblent supérieurs à ceux rapportés par Sadek *et al.* (2015), qui ont trouvés des taux de bactéries sporulées aérobies de $2,8 \times 10^2$ et $2,3 \times 10^2$ UFC/g dans des fromages fondus en bloc et des fromages fondus en portions respectivement.

Il est important de rappeler que la gélose Mossel n'est pas proprement dit un milieu sélectif de *B. cereus* puisque les autres espèces du groupe *B. cereus* sont également mannitol négatives et lécithinase positives (Van Netten et Kramer, 1992; Guinebretière, 2001). Par ailleurs, les zones de précipitation peuvent se chevaucher et les colonies de *B. cereus* peuvent s'unir ce qui empêche une énumération précise (Peng *et al.*, 2001).

La contamination du fromage fondu par *B. cereus* serait probablement due aux matières premières utilisées : lait écrémé en poudre, fromage cheddar, concentré de protéines de lait, etc. Elle serait également due aux méthodes de travail à la non maîtrise des températures, aux ruptures de la chaîne du froid, à la non maîtrise des dosages des additifs alimentaires tels que les conservateurs (Guiraud, 2012). Aussi, Heyndrickx, (2011) stipule qu'il existe une association claire entre les spores contaminant le lait, et les spores isolées de site fabrication du fromage fondu

Il est à remarquer que les taux enregistrés dans ce travail sont proches des valeurs seuil provoquant une intoxication alimentaire qui est égale ou supérieur à 10^5 spores/g de produit (Salustiano *et al.*, 2009). En effet, *Bacillus cereus* peut causer deux types de problèmes à l'industrie laitière :

Le premier est lié à la qualité des produits, *B. Cereus* provoque des changements qui rendent un produit inacceptable pour la consommation humaine (Merzougui *et al.*, 2013). Les défauts causés par ces bactéries sont l'apparition de goût désagréable et de défauts de structure causés par les enzymes protéolytiques et lipolytiques produits par ces bactéries (Heyndrickx et Scheldeman, 2008; Anzueto, 2014). D'après Oliveira *et al* (2016), les problèmes liés à la détérioration des fromages fondus par *Bacillus cereus* peuvent atteindre des proportions économiques considérables

La deuxième conséquence de la croissance de *Bacillus* dans le fromage fondu est liée à la sécurité (Glass et Doyle, 2013). Parmi les espèces du groupe *B. cereus*, certaines sont pathogènes et peuvent causer des intoxications alimentaires à syndromes diarrhéique et émétique (Fernández-No *et al.*, 2011; Lücking *et al.*, 2013; EFSA, 2016).

La charge microbienne des fromages fondus dépend de nombreux facteurs, notamment le type de fromage utilisé comme matière première, le pH, la teneur en matière sèche, la teneur en chlorure de sodium, la concentration et le type de sels émulsifiants et les barèmes de traitements thermiques utilisés lors de la fabrication (Glass et Doyle, 2013).

Par ailleurs, le stockage à basse température, à pH et a_w réduits, et l'utilisation d'agents conservateurs, fonctionnent souvent en synergie pour lutter contre les spores (Herr, 2011; Nagyová *et al.*, 2014; Khanipour *et al.*, 2016).

D'après l'analyse en composantes principales (ACP) que nous avons effectuée pour voir l'affinité entre les caractéristiques physico-chimiques et les caractéristiques bactériologiques des différents fromages fondus analysés (projection d'un nuage de 07 individus (fromages) dans un espace à 11 dimensions (nombre de paramètres physicochimiques et bactériologiques), nous avons abouti aux résultats illustrés par la figure 20.

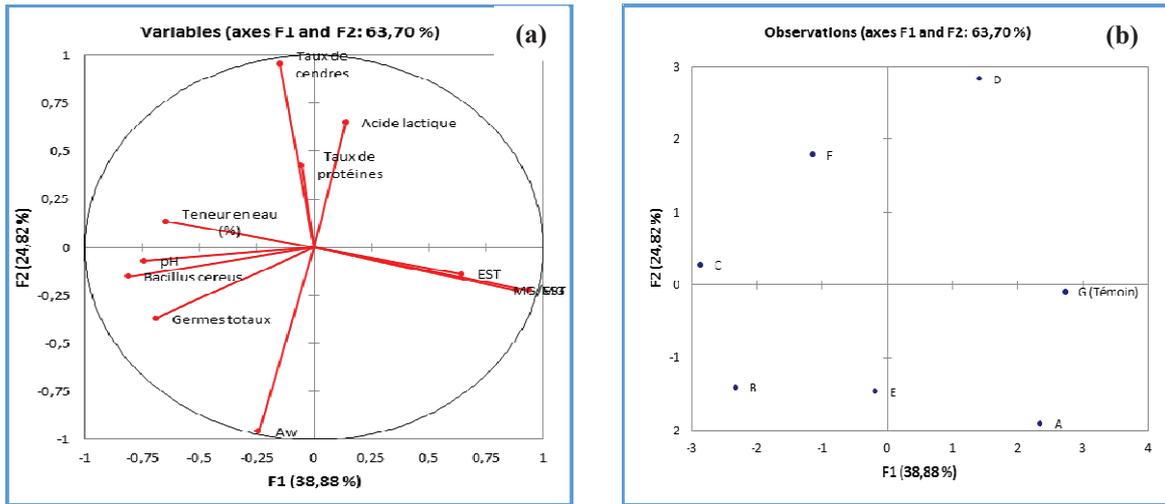


Figure 20: Représentation des caractéristiques des fromages par l'application de l'ACP (a) et la projection des individus (b).

Sur cette figure, on constate que les deux premiers axes expliquent 63.70% de l'information, le premier axe F1 explique à lui seul une variabilité de 38.88% et est fortement corrélé au rapport G/S et à la matière grasse (MG) ainsi qu'à l'extrait sec total (EST) et est fortement négativement corrélé à la FMAT, au taux de *B. cereus* et au pH. Cet axe F1 oppose les individus « A » et « G » fortement liés aux EST, MG et G/S aux individus « B » et « C » qui sont eux très fortement liés aux paramètres FMAT, *Bacillus cereus* et pH.

En opposant le rapport Gras/sec, la matière grasse (MG) et l'extrait sec total à la teneur en eau et au taux de *Bacillus cereus*, l'axe 1 permet de dire que les fromages ayant une teneur en matière grasse élevée sont riches en extrait sec total (ou à faible teneur en eau) et ont un nombre réduit en *Bacillus cereus*.

Selon [Hauerlandová et al. \(2014\)](#), dans les échantillons de fromage fondu, les monoacylglycérols à la concentration de 0,15 % w/w ont empêché la croissance et la multiplication de *B. subtilis* et *B. cereus* tout au long de la période de stockage et la croissance de ces deux espèces de *Bacillus* a été affectée par le niveau de graisse du fromage fondu avec 30, 40 et 50 % de matière grasse dans la matière sèche. Il y aurait donc une relation entre le taux de matière grasse et le nombre de *B. cereus* trouvé.

En effet, la matrice de corrélation (**Voir tableau 12**) montre une corrélation négative significative au seuil $\alpha = 5\%$ entre la teneur en eau et la matière grasse ($R=-0.77$) et le rapport Gras/sec avec *Bacillus cereus* ($R=-0.80$).

Le deuxième axe F2 explique aussi une part importante de variabilité de l'ordre de 24.82%, cet axe est très positivement corrélé aux taux de cendres et très négativement corrélé à l'activité de l'eau « a_w ». Cet axe oppose les individus « D » et « F » fortement liés aux taux de cendres à l'individu « E » particulièrement lié à l' a_w . La matrice de corrélation (**Voir tableau 12**) confirme en effet cette interprétation et on remarque une corrélation positive significative au seuil $\alpha = 5\%$ entre la FMAT et le pH avec un coefficient de corrélation de 0.93 et une corrélation significativement négative entre le taux de cendres et l'activité de l'eau de l'ordre de -0.87. Cet axe peut être qualifié d'axe pH, a_w .

Tableau 12: Matrice de corrélation (r de Pearson)

Variables	pH	a_w	EST	Teneur en eau	MG	MG/EST	Taux de cendres	Taux de protéines	Acide lactique	FMAT	<i>Bacillus cereus</i>
pH	1,00										
a_w	0,20	1,00									
EST	-0,15	-0,15	1,00								
Teneur en eau	0,15	0,15	*-1,00	1,00							
MG	-0,52	-0,03	*0,77	*-0,77	1,00						
MG/EST	-0,61	0,06	0,42	-0,42	*0,90	1,00					
Taux de cendres	0,08	*-0,87	-0,20	0,20	-0,32	-0,30	1,00				
Taux de protéines	0,00	-0,50	0,22	-0,22	-0,18	-0,44	0,24	1,00			
Acide lactique	0,22	-0,63	0,08	-0,08	0,15	0,20	0,72	-0,15	1,00		
FMAT	*0,93	0,47	-0,08	0,08	-0,40	-0,48	-0,18	-0,22	0,05	1,00	
<i>Bacillus cereus</i>	0,67	0,26	-0,17	0,17	-0,66	*-0,80	0,02	0,15	-0,22	0,74	1,00

* Valeurs significatives à $p < 0,05$

III. 2.2. Caractérisation des isolats présumés appartenir au groupe *Bacillus cereus*

III. 2.2.1. Caractérisation morphologique

Cette partie de l'étude a concerné les colonies que nous avons isolées suite aux résultats de la première partie concernant le dénombrement de *Bacillus cereus* sur milieu gélosé de Mossel. Ces colonies sont donc présumées appartenir au groupe *Bacillus cereus*.

L'examen macroscopique a montré la présence de colonies caractéristiques de *Bacillus cereus*. Ces colonies sont grandes, roses, entourées d'un halo blanchâtre de précipitation.

Ensuite, chaque isolat a été étalé sur une gélose de Mossel et incubé à 37 °C pendant 24 heures ce qui nous a permis une comparaison avec la souche de référence *Bacillus cereus* ATCC® 14579. La gélose MYP de Mossel est préconisée par l'organisation internationale de normalisation (ISO). La norme ISO 7932:2004 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs revivifiables par comptage des colonies à 30°C. L'étape de confirmation consiste à la caractérisation des colonies sur le milieu MYP et au test de l'hémolyse. Le terme «présomptif» a donc été introduit de façon à souligner le fait que l'étape de confirmation ne permet pas de faire la différence entre *B. cereus* et d'autres espèces proches mais néanmoins moins rencontrées, comme *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*. Un test de mobilité effectué en plus peut toutefois aider à la différenciation entre *B. cereus* et *B. anthracis*, dans les cas où la présence de ce dernier est suspectée (Norme ISO 7932:2004). Un nouveau milieu, la gélose chromogène contenant un substrat chromogénique permettant la détection de la phospholipase C (PLC) de *B. cereus*, a été mis au point (Tallent *et al.*, 2012). Ce milieu est plus sélectif que celui de Mossel.

L'examen microscopique après la coloration de Gram a révélé que toutes les souches présumées *Bacillus cereus* étaient sous forme de bâtonnets à Gram+. Par ailleurs, l'observation microscopique après coloration au vert de malachite de la spore indique la présence des spores colorées en verts (voir figure 21).

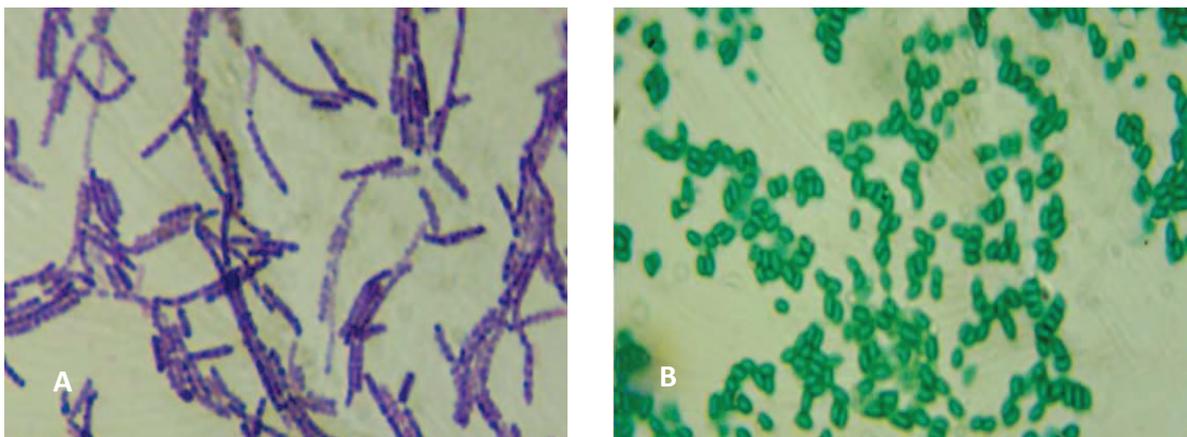


Figure 21: Observation microscopique d'un isolat présumé *Bacillus cereus* provenant d'un des fromages fondus étudiés après coloration de Gram (x12500) (photo A) et coloration de spores au vert de malachite (x12500) (photo B).

III. 2.2.2. Caractérisation physiologique et biochimique des isolats

Quatre tests physiologiques et biochimiques ont été réalisés. Il s'agit de la recherche de la catalase, de la fermentation du mannitol, de la lécithinase, l'hémolysine. Pour ces quatre tests, *Bacillus cereus* est Catalase +, mannitol -, lécithinase + et hémolysine +.

Tous les isolats qui étaient Catalase +, mannitol -, lécithinase + et hémolysine +, ont été retenus. Cela augmente la probabilité que ces isolats soient bien du groupe *Bacillus cereus*.

III. 2.3. Identification moléculaire des isolats présumés *B. cereus*

III. 2.3.1. Vérification de la qualité de l'ADN

Six spores présumées de *Bacillus cereus* (une spore/fromage) ont été retenues pour être identifiées en se basant sur le séquençage génomique ADN_r16S. Pour ce faire, la pureté de l'ADN génomique a d'abord été vérifiée et un dosage de sa concentration ($\mu\text{g/mL}$) a été réalisé en se basant sur son spectre d'absorbance. La courbe de balayage d'absorbance (**Voir figure 1, annexe 2**) nous permet d'évaluer la pureté et la quantité de l'ADN bactérien à la fois. Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ doit être au voisinage de 1,7.

III. 2.3.2. Amplification et séquençage de l'ADN_r 16S

Les produits de PCR amplifiés sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1%. A la fin de la migration, le gel est trempé dans une solution de bromure d'éthidium à $0,5\mu\text{g/mL}$ pendant 20 minutes puis visualisé sous un transmetteur de la lumière UV relié à un appareil photo (**Voir figure 22**).

Le séquençage de l'ADN_r16S, a révélé que les isolats retenus appartiennent bien au groupe *Bacillus cereus* sensu lato.

Les résultats de l'affiliation des six souches de *Bacillus cereus* suite au séquençage du gène panC selon [Guinebertière et al. \(2010\)](#) ont montré que toutes les six souches appartiennent au groupe III avec plus de 97% d'homologie. Il s'agit d'un groupe mésophile correspondant à l'espèce *Bacillus thuringiensis* III, *Bacillus cereus* III ou *Bacillus anthracis*. Les souches de ce groupe sont généralement cytotoxiques. Elles produisent leurs toxines dans le produit alimentaire. Les souches de *Bacillus cereus* de ce groupe sont impliquées

dans le syndrome émétique mais pas dans le syndrome diarrhéique (Guinebretière *et al.*, 2008; Kumari et Sarkar, 2014).

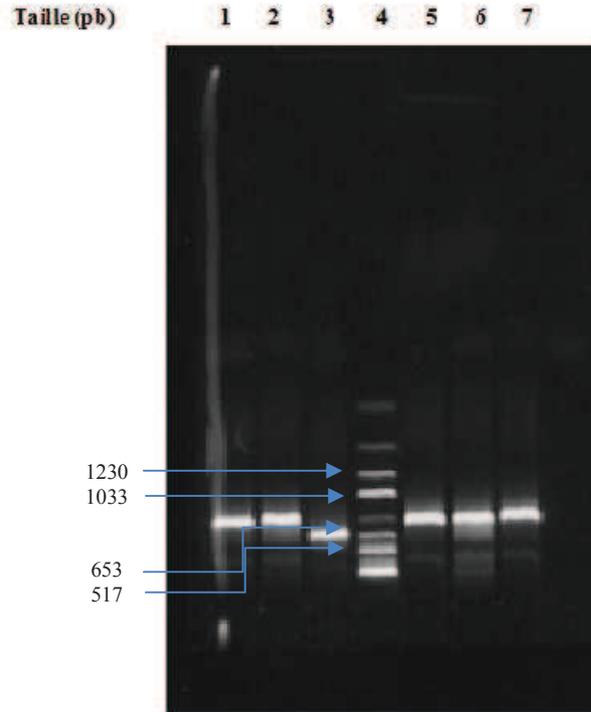


Figure 22: Amplification de l'ADN ribosomal 16S des souches présumées de *Bacillus cereus*. Souche LMBc001 (canal 1); souche LMBc002 (canal 2), souche LMBc003 (canal 3); marqueur de taille (canal 4) ; souche LMBc004 (canal 5); souche LMBc005 (canal 6); souche LMBc006 (canal 7).

III. 2. 4. Détermination des valeurs minimales du pH et d' a_w de croissance de *Bacillus cereus*

Le pH minimal de croissance pour les six souches étudiées varie de 4,72 à 5,10 alors que les valeurs d' a_w minimale obtenues varient de 0,940 à 0,951 (**Voir Tableau 13**).

L'influence du pH et de l' a_w sur le développement de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu n'a pas été étudiée auparavant, cependant, Carlin *et al.*, (2013), dans le milieu BHI et dans le cadre d'une étude sur les limites de croissance selon l'appartenance phylogénétique dans le groupe *Bacillus cereus* trouvèrent des valeurs de pH minimum variant entre 4,63 et 4,65 pour le groupe III de *Bacillus cereus* et des valeurs d' a_w de 0,941 à 0,944. Dans une autre étude portant sur l'évaluation du risque alimentaire dû à *Bacillus cereus* et ses toxines menée par Notermans et Batt (1998), les valeurs d' a_w min rapportées variaient de 0,912 à 0,950 et des valeurs de 4,35 à 4,90 pour les pH min. Lanciotti *et al.* (2001) ont, quant à eux, trouvé des valeurs de a_w min=0,951 et pH min=4,75 pour *B. cereus*.

Tableau 13: Valeurs de pH et a_w minimales de six souches de *Bacillus cereus* isolées de six marques de fromage fondu fabriqué en Algérie.

Souches	pH min	pH du fromage	a_w min	a_w du fromage
LMB _C F001	4,72	5,75	0,940	0,978
LMB _C F002	4,93	5,84	0,940	0,980
LMB _C F003	5,10	6,16	0,951	0,975
LMB _C F004	5,10	5,74	0,951	0,965
LMB _C F005	4,93	5,86	0,940	0,981
LMB _C F006	5,10	5,71	0,951	0,971

Lorsque les conditions physicochimiques sont au-dessus du minimum requis pour la croissance, la combinaison de ces conditions s'avère plus stressante et affecte le taux de croissance de *B. cereus* (Quintavalla et Parolari 1993). Il est donc possible d'identifier des combinaisons des facteurs de température, de pH et d' a_w capables d'empêcher la croissance de *B. cereus*. Une implication pratique peut être tirée pour l'identification de conditions qui peuvent être appliquées à la conservation des aliments afin de s'assurer qu'aucune croissance de ce micro-organisme ne se produira (Lanciotti *et al.*, 2001).

Valero *et al.* (2003) en étudiant l'influence du pH et de la température sur la croissance de *Bacillus cereus* dans des produits végétaux ont trouvés que le pH minimum pour sa croissance dépend à la fois des souches et de la nature des acidulants. En fonction de la technologie du fromage fondu employée et de la durée du stockage, l'inhibition des spores peut être obtenue en utilisant des additifs chimiques, la biopréservation, la réduction du pH, ou une combinaison de facteurs inhibiteurs. Les nitrates, l'hexaméthylène tétramine (HMT) et les polyphosphates sont des produits chimiques courants utilisés pour prévenir les spores, en particulier les clostridies, dans l'industrie fromagère (Herr, 2011).

Par ailleurs, les spores bactériennes persistantes peuvent germer au cours du stockage ou la distribution conduisant ainsi à l'altération des aliments ou à des intoxications alimentaires (Peña *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2015,). Une fois présente dans le produit fini, les spores peuvent lentement germer et se multiplier si le pH et l'activité de l'eau sont suffisants, même à basse température de stockage, conduisant à la détérioration du produit ou à des problèmes de sécurité. Le temps requis pour que la détérioration ou les agents

pathogènes atteignent des niveaux infectieux dépend de la stabilité microbiologique de la formulation, des conditions de température de stockage et des caractéristiques des bactéries formant des spores présentes dans le produit fini (Oliveira *et al.*, 2016).

III. 2. 5. Étude de la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*

III. 2. 5. 1. Détermination des paramètres de thermorésistance.

Pour cette partie de l'étude, quatre spores ont été retenues. (LMB_C002, LMB_C003, LMB_C004 et LMB_C006). Avant le traitement thermique des photos ont été prises grâce à un microscope à contraste de phase muni d'un appareil photo. Afin de l'aspect des spores. Celles-ci apparaissent bien séparées les unes des autres. (voir figure 2 en annexe2)

Les résultats de l'étude de la thermorésistance des quatre spores de *Bacillus cereus* sont donnés par le tableau N°14. D'après ces résultats, on remarque que les valeurs de D_{110°C} varient de 1,84 min à 39,50 min. Ces valeurs ont été bien plus élevées aux valeurs de D_{110°C} obtenues par Gonzalez *et al.*, (1999), qui varient entre 0,080 à 0,36 min. Les valeurs de D_{120°C} varient entre 4,76 et 9,30 min et sont également plus élevés que celles mentionnées par Russell (1999) avec une valeur de D_{120°C} égale à 2,37min, Cette valeur de D diffère aussi selon le groupe phylogénétique de l'espèce bactérienne (ANSES, 2011) Dans cette étude, *B. cereus* LMB_CF003 est apparue comme la souche la plus résistante alors que *B. cereus* LMB_CF006 était la plus thermosensible.

(Voir tableau 14, figure 23).

Les valeurs de D que nous avons obtenues sont beaucoup plus élevées que celles rapportées en général par la littérature scientifique. Ces valeurs ont été vérifiées ce qui nous laisse penser qu'il s'agit bien de spores particulièrement thermorésistantes. Cette résistance exceptionnellement élevée peut être expliquée par une pression sélective due à l'usage exagéré des traitements thermiques appliqués en général en industrie alimentaire en Algérie. Cela est dû au fait que des essais d'optimisation n'ont pas lieu. Par ailleurs, dans le milieu de l'industrie agroalimentaire algérienne, on imagine que des traitements thermiques plus sévères peuvent compenser une non-maitrise d'hygiène. Enfin les industriels algériens sont peu regardants sur le coût des traitements thermiques vu que l'énergie est relativement à bon prix en Algérie.

Tableau 14: Valeurs de D estimées (min) et Z_T (°C) pour les spores de *B. cereus* isolées à partir de fromages fondus

	LMB _C F002	L MB _C F003	LMB _C F004	LMB _C F006
D₁₀₀ (min)			7,67	
D₁₀₅ (min)	13,92		4,94	47,02
D₁₁₀ (min)	08,76	39,50	1,84	
D₁₁₅ (min)	04,71	20,83		20,66
D₁₂₀ (min)		4,76		9,30
Z_T (°C)	21,28	10,80	16,13	22,15

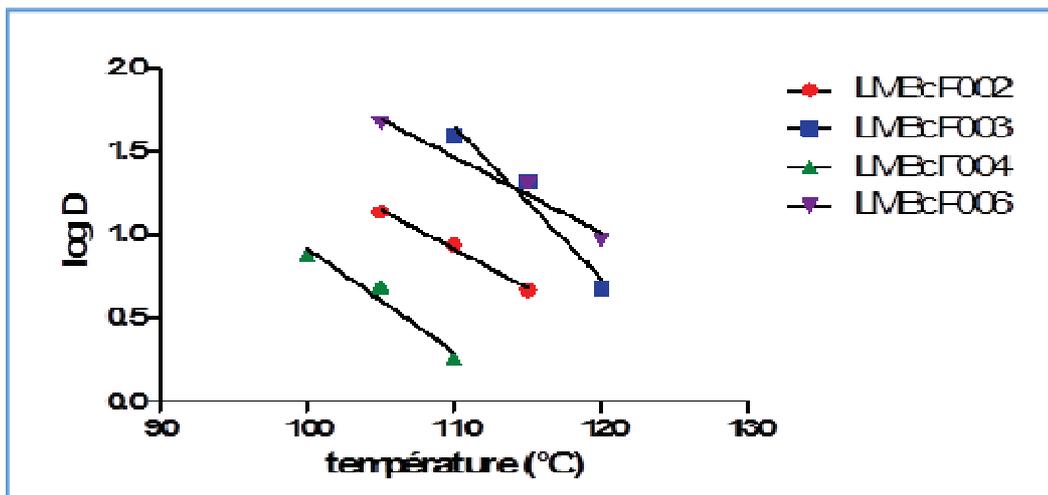


Figure 23: Courbe de survie de quatre souches de spores de *Bacillus cereus* isolées de quatre marques de fromage fondu Algérien.

La survie des spores dépend également des caractéristiques de l'aliment : une a_w faible diminue la thermosensibilité des microorganismes et un pH bas l'augmente. Ainsi la nature biochimique de l'aliment : les lipides conduisent moins bien la chaleur que l'eau d'où une meilleure résistance des microorganismes dans les produits gras (Bimbenet *et al.*, 2007; Leuschner et Lillford, 2003; Jeantet *et al.*, 2011),

L'âge de la souche semble avoir un effet sur sa thermorésistance. La manière dont les spores ont été produites interviendrait également sur leur thermorésistance (Ryu et Beuchat, 2005). Par ailleurs, les spores d'une même espèce bactérienne peuvent présenter une grande

variabilité dans leur thermorésistance (Shull *et al.*,1963 et Ababouch *et al.*,1987 in Samapundo *et al.*, 2014).

La présence d'amidon dans certaines types de fromages semble également augmenter la thermorésistance de la spore en la protégeant (Oteiza *et al.*, 2003).

Les valeurs Z_T de la thermosensibilité des spores étudiées varient de 10,80 à 22,15°C.. Les valeurs Z_T de la souche LMB_CF003 est dans la gamme de Z_T rapportées par la littérature pour les spores de *Bacillus cereus*. Par ailleurs les valeurs Z_T pour les souches LMB_CF002, LMB_CF004 et LMB_CF006 sont plus élevées. La valeur la plus élevée de Z_T est (22,15°C), elle a été obtenue pour la souche LMBCF006 de *Bacillus cereus*.

Les valeurs de Z_T pour *Bacillus cereus* varient entre 8 à 12,5 °C selon l'ANSES (2011), 8 à 8,6 °C selon (Byrne *et al.*, 2006) et de 6,7 à 10,1 °C selon Caudrillier (2008). Mayoraz (2006) indique une valeur de Z_T égale à 15°C, Les valeurs de Z_T qui caractérisent le groupe III sont de l'ordre de 8,4°C selon Luu Thi *et al.*,(2014).

III. 2.5.2. Étude de l'effet du pH sur la thermorésistance des spores de *Bacillus cereus*

Les résultats de l'influence de valeurs de pH allant de pH7 à pH4.5 sur la thermorésistance de la souche LMBCF002 à 102°C, sont donnés par la **figure 24** et le **tableau 15**. Ces résultats montrent que la valeur D diminue avec l'abaissement du pH. $D_{102^\circ\text{C}}$ de la spore étudiée LMB_CF002 décroît de 6,96 min à pH7 au 0,95 min à pH4,5. Les résultats concordent avec celles citées par Lopez *et al.* (1997) et Couvert (1999). La diminution de la résistance est liée à la concentration des protons. Cette diminution pourrait ne pas être brusque, mais progressive (Weiss, 1921).

La valeur Z_{pH} obtenue est 2,95°C. Cette valeur est inférieure des résultats obtenus par Gaillard *et al.* (1998), qui indiquent une valeur de Z_{pH} de 4,08 avec un pH qui varie de 4,5 à 6,6 à la même température. Plus le pH de l'aliment est éloigné de la neutralité, plus les micro-organismes sont sensibles à la chaleur (Jeantet *et al.*, 2011). Ainsi l'effet des faibles valeurs de pH semble avoir des conséquences variables sur la valeur du paramètre Z_{pH} ,

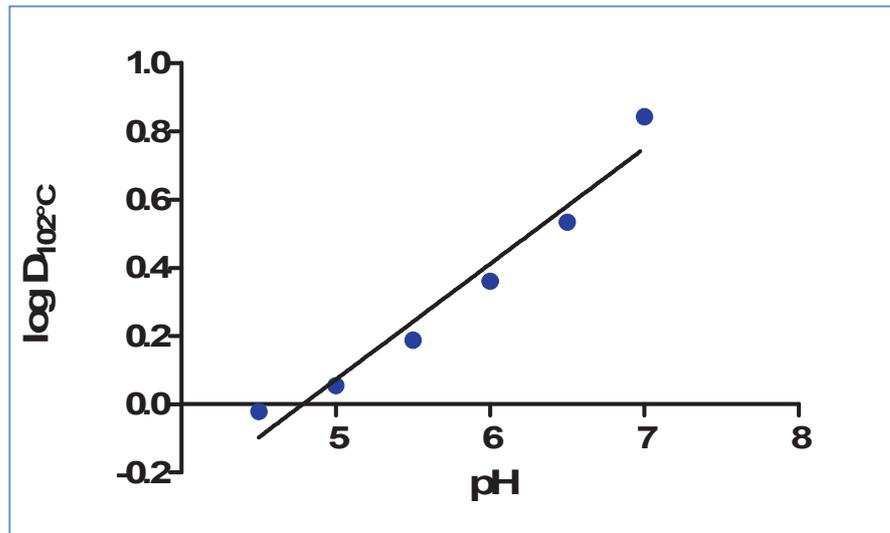


Figure 24: Effet de variation de pH sur la thermorésistance de la spore *Bacillus cereus* LMBCF002 a 102°C.

Tableau 15: Thermorésistance de *Bacillus cereus* LMB_CF002 étudiée à différentes valeurs de pH à 102°C

pH	7	6,5	6	5,5	5	4,5
D _{102°C} (min)	6.96±0,01	3.43±2,60	2,28±1,2	1,54±0,8	1,14±0,5	0,95±0,6
Z _{pH}	2,95±0,05					

III. 2.4.3. Détermination de la thermorésistance de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu

La détermination de la thermorésistance en matrice alimentaire permet de suivre le comportement d'un germe inoculé dans cette matrice alimentaire (**Voir figure 25**). Toutes les souches de *Bacillus cereus* étudiées ont la même forme de la cinétique de survie dans le fromage fondu comme dans le milieu de traitement (bouillon nutritif) de 110 à 120°C.

La thermorésistance des bactéries en matrice alimentaire est différente aux traitements réalisés en milieu de laboratoire puisque le temps de réduction décimale est différent dans la matrice alimentaire que celui calculé dans le bouillon nutritif. D'après les résultats obtenus

on remarque que le $D_{110^{\circ}\text{C}}$ varie entre 4,60 minutes pour la souche *B. cereus* LMB_CF004 et 27,89 minutes pour la souche *B. cereus* LMB_CF006 vs une valeur de $D_{110^{\circ}\text{C}}$ variant entre 1,84 minute dans un bouillon nutritif pour la souche *B. cereus* LMB_CF004 et 39,50 minutes pour la souche *B. cereus* LMB_CF003.

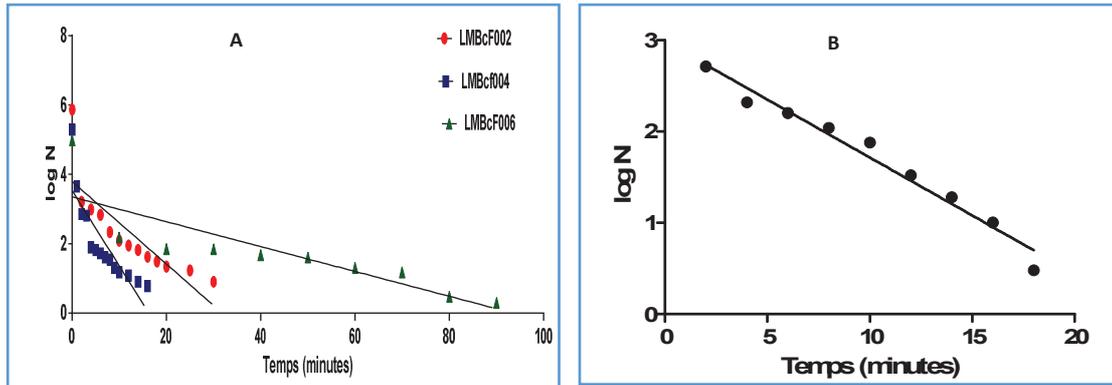


Figure 25 : Détermination de la thermorésistance de *Bacillus cereus* dans le fromage fondu algérien, *B. cereus* LMB_CF002, LMB_CF004 et LMB_CF006 à 110°C (A), *B. cereus* LMB_CF003 à 120°C (B).

La persistance des spores pourrait être expliquée par le type de matrice : dans une matrice solide, les microenvironnements locaux où l' a_w est plus faible, les bactéries situées dans ces microenvironnements sont plus résistantes à la chaleur que la population globale (Coroller *et al.*, 2006). Dans le cas contraire, les produits alimentaires sont plus complexes que le bouillon nutritif et peuvent inclure des composants qui pourraient protéger les spores (Leguerinel *et al.*, 2005, Samapundo *et al.*, 2014). Il est donc très probable que les macromolécules présentes dans les aliments comme la graisse, les protéines et l'amidon peuvent influencer l'effet d'un traitement thermique sur la survie des spores dans les produits alimentaires (Samapundo *et al.*, 2014).

III. 2.5. Détection de toxines de souches de spores de *Bacillus cereus*

D'après les résultats de la détection des toxines, on remarque que les souches *Bacillus cereus* LMBCF002 et LMBCF003 isolées des échantillons « B » et « C » respectivement produisent des entérotoxines de type Nhe (NheA et NheB), alors que celles isolées « A » et « E » ne le font pas. L'échantillon « D » dont la qualité et la quantité de l'ADN était très faible n'a pas pu être amplifié.

Aucune souche n'a produit les autres entérotoxines telles que l'entérotoxine HBL (hblA et hblD) et la Cereulide (**Voir figure 26**). La présence des entéotoxines de type Nhe responsable du syndrome diarrhéique causé par *Bacillus cereus* dans le fromage fondu a déjà été rapporté par les travaux de [Gitahi et al. \(2009\)](#). Ces mêmes auteurs ([Gitahi et al., 2009](#)) ont détecté la présence des enterotoxines hblA et hblD dans le fromage fondu, alors que nous avons noté leur absence dans ce travail

Pour que la toxine Nhe ait une action toxique, il faut la présence de trois protéines différentes et un rapport défini des composants individuels. Ce rapport est : Nhe A/B/C=10/10/1, pour une cytotoxicité maximale ([Zhu et al., 2016](#)).

L'incidence de contamination du lait et des produits laitiers par *Bacillus cereus* productrices des entérotoxines Hbl, Nhe et CytK a été rapportée par ([Stenfors Arnesen et al., 2008](#) ; [Fagerlund et al., 2010](#)).

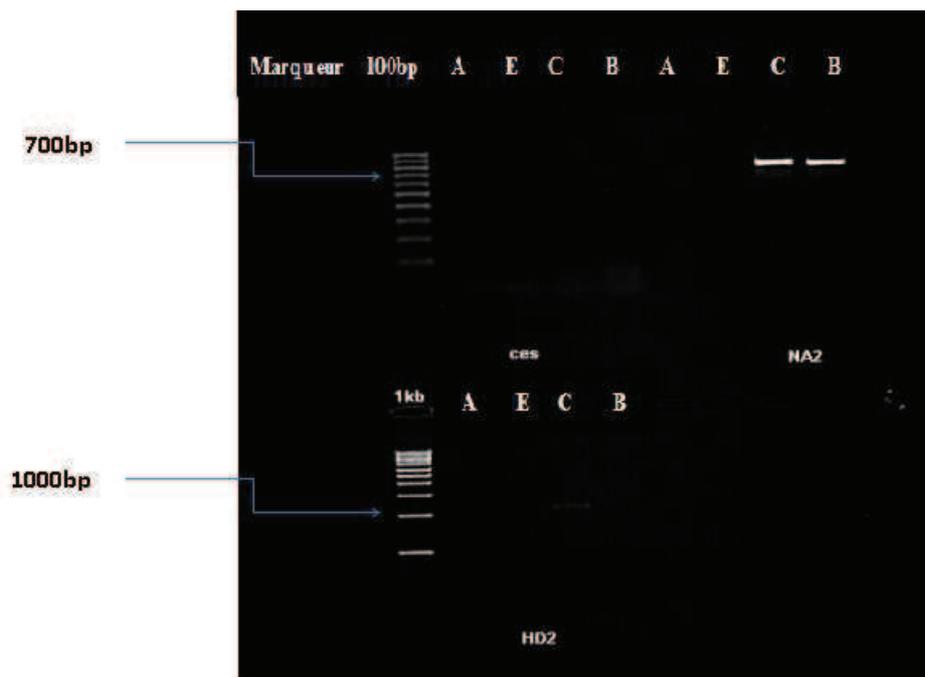
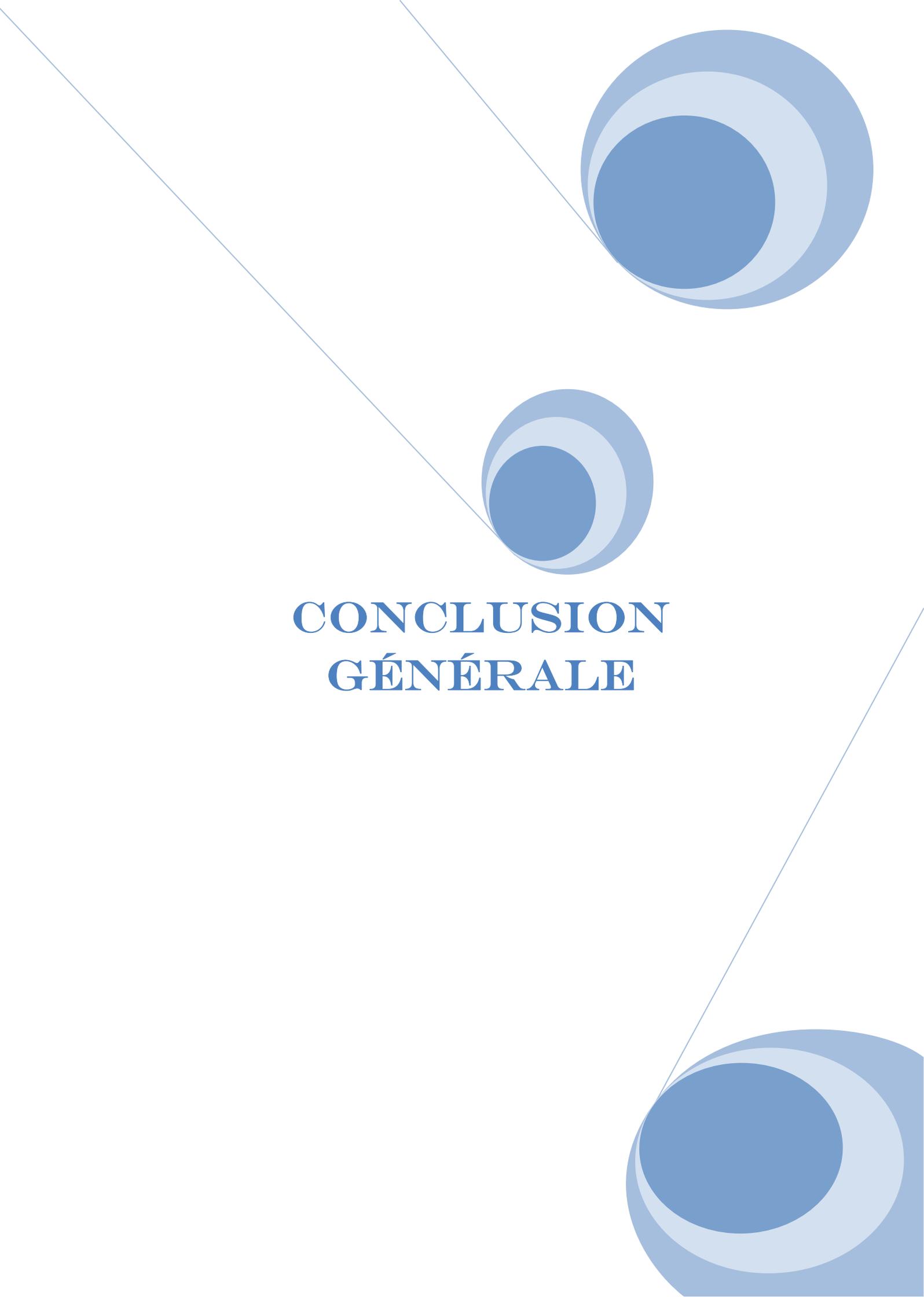


Figure 26: Détection des toxines produites par les souches de *Bacillus cereus* groupe III isolés de fromage fondu fabriqué en Algérie.

Marqueur de taille, A: souche LMBC 001 isolée du fromage de marque « A », B: souche LMBC 002 isolée du fromage de marque B, C: souche LMB003 isolée du fromage de marque « C », E: souche LMBC 005 isolée du fromage de marque « E »,
CES, Cereulide synthétase; NA2, Composante d'entérotoxine A non hémolytique; NB1, Composante d'entérotoxine B non hémolytique HD2, Composante d'entérotoxine D hémolytique; HA4, Composant hémolytique d'entérotoxine A.

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes, each composed of concentric layers of different shades of blue. These circles are positioned in the top right, center, and bottom right areas. A thin blue line runs diagonally from the top left towards the center, and another thin blue line runs diagonally from the top right towards the bottom right.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Malgré la diversification du marché des fromages en Algérie, le fromage fondu demeure le fromage le plus populaire et le plus consommé. Les fromages à pâte pressée et les fromages à pâte dure restent considérés comme des produits de luxe.

Toutefois, le fromage fondu peut être sur le plan hygiénique corrompu en raison de contaminations microbiennes. Parmi les contaminants, *Bacillus cereus* est généralement présent alors que sa recherche comme critère ne figure pas parmi les spécifications microbiologiques du fromage ([Arrêté ministériel JO35, 1998](#)).

Les résultats d'analyses physicochimiques montrent que la qualité des marques de fromages fondus étudiés est satisfaisante. D'après ces résultats on remarque qu'il existe des différences importantes de paramètres technologiques entre producteurs. Ces différences traduisent des variations dans le procédé de fabrication et ont des effets sur les caractéristiques du produit fini. Ainsi il apparaît que le choix des matières premières fromagères constitue une étape déterminante dans la réussite du processus de fonte et du produit fini.

Les analyses bactériologiques effectuées montrent la présence de *Bacillus cereus sensu lato* dans tous les échantillons de fromage fondu étudiés sauf dans l'échantillon de référence. Les souches de *Bacillus cereus* isolées appartiennent au groupe III selon la classification de [Guinebretière et al. \(2010\)](#).

Les études relatives à la thermorésistance montrent que ces spores sont hautement thermorésistantes. Après validation des résultats dans la matrice alimentaire, la preuve est faite que ces spores peuvent se développer dans le fromage fondu. En effet les spores de *Bacillus cereus* ont démontré un potentiel de croissance considérable dans ce produit.

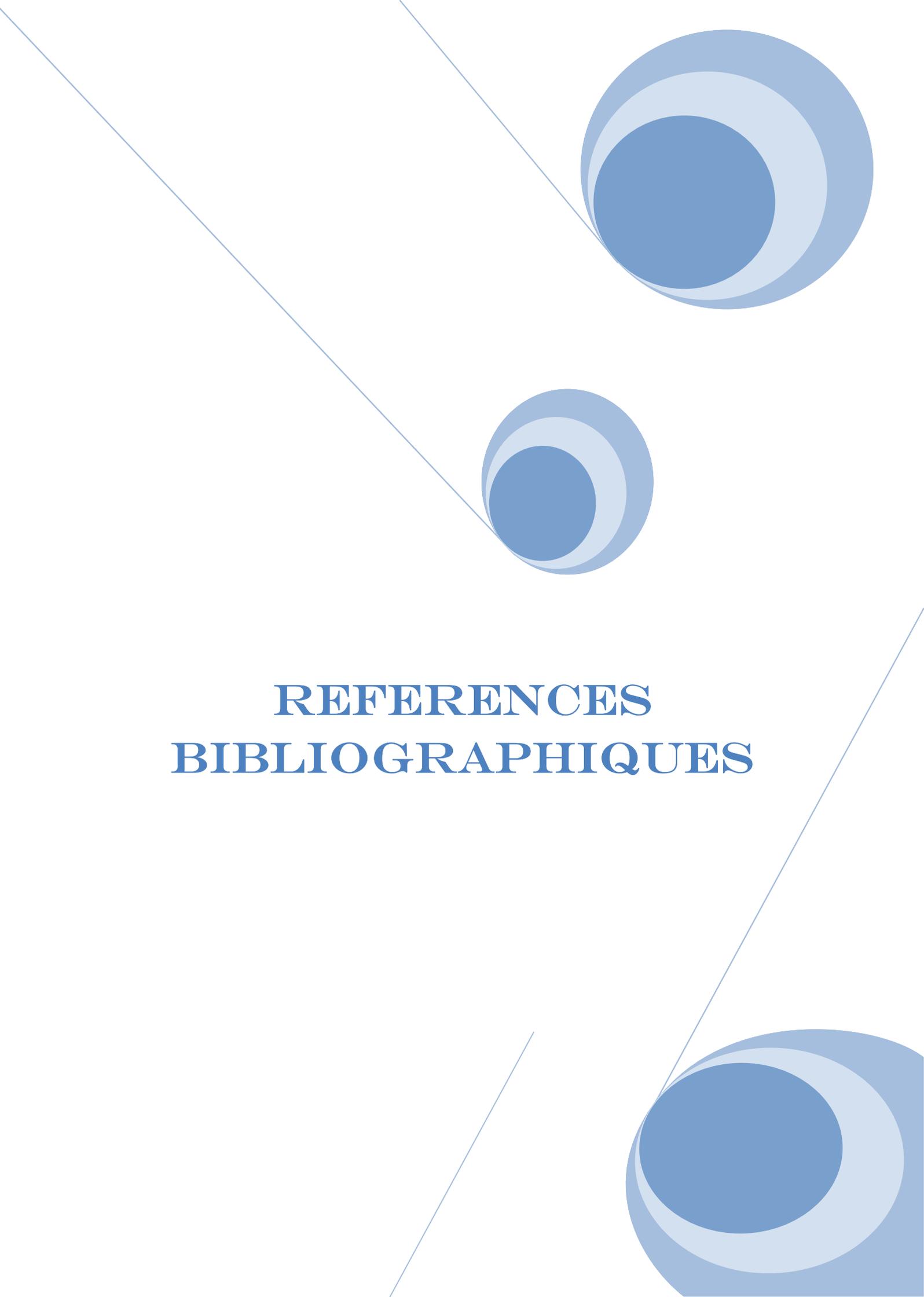
Ces résultats peuvent expliquer en partie pourquoi les agents non identifiés responsables d'intoxication alimentaire sont si importants dans les statistiques algériennes de toxi infections alimentaires recensés en Algérie en 2015. Cette fraction qui représente 19,56% peut être causée par des germes parmi lesquelles figure certainement *Bacillus cereus*. Ce pathogène opportuniste est à l'origine de deux types de toxi-infection alimentaire. L'une causée par un petit peptide toxique (Cereulide) est à l'origine du syndrome émétique, et l'autre causée par un ensemble de toxines protéiques produites dans l'intestin grêle (HBL, Nhe et CytK) est à l'origine du syndrome diarrhéique.

Les spores de *B.cereus* posent de sérieux problèmes dans les industries laitières car non seulement, elles sont résistantes à la chaleur mais elles ont la capacité d'adhérer fortement à de nombreuses surfaces notamment l'acier inoxydable des équipements. Elles peuvent survivre dans l'aliment malgré les traitements thermiques appliqués et sont

capables de traverser le tractus gastro-intestinal. La forte incidence de *Bacillus cereus* trouvée dans le fromage peut être expliquée en partie par ses propriétés d'adhésion aux surfaces de l'industrie laitière.

Concernant la production de toxines on remarque que les souches isolées ne produisent pas les entérotoxines HBL (hblD et hblA) et la Cereulide tandis que deux souches isolées des échantillons B et C produisent des entérotoxines de type Nhe (NheA et NheB). Des analyses complémentaires permettraient de définir la dose de toutes les toxines produites par *Bacillus cereus* y compris la céréulide et l'enterotoxines Nhe l'Hémolysine BL et la cytotoxine K

L'absence d'une réglementation nationale relative aux fromages fondus et au critère *Bacillus cereus* pose de problèmes sur le plan de l'interprétation de la qualité microbiologique de ces produits. Il serait essentiel d'élaborer des normes et des spécifications afin de lutter contre les pratiques frauduleuses et de renforcer les mesures de contrôle pour le fromage fondu d'une part parce qu'il est le plus consommé en Algérie notamment par la population infantile et pour le critère *Bacillus cereus* d'autre part puisque c'est un germe responsable de toxi-infection alimentaire collective. Ceci est un thème de préoccupation de santé publique. Ce travail confirme qu'il est essentiel de s'assurer de la qualité des matières premières, des bonnes pratiques de fabrication et d'hygiène, des températures de distribution et de stockage pour obtenir des produits finis qui soient microbiologiquement stables et salubres.

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes and two thin blue lines. One line runs diagonally from the top-left towards the center, and another runs diagonally from the top-right towards the center. The circles are positioned at the top-right, center, and bottom-right of the page.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références Bibliographiques

- A.C.I.A.: Agence Canadienne d'Inspection des Aliments (2014). Manuel d'inspection des établissements laitiers. Chapitre 13. Tâches Liées aux traitements thermiques. <Http://www.Inspection.Gc.Ca/Aliments/Produits-Laitiers/Manuel-Procdures-D-Inspection/Manuel-D-Inspection-Des-Etablissements-Laitiers/Chapitre-13/Fra/1378105207824/1378105208527>. Consulté le 30 Aout 2016.
- Abbas K.A., Khalil S.K., and Hussin A.S.M. (2010). Modified starches and their usages in selected food products : A review study. *J Agr Sci*, 2, 90 -100.
- AFNOR (Association Française de Normalisation) (1980) : Lait. Détermination de la matière sèche. NF V04-207, dans Afnor (Ed.), recueil de normes françaises. Laits et produits laitiers. Méthodes d'analyse. Paris : Normalisation française, P. 33-34.
- Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I. And Isobe M. (1994). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in hep-2 cells. *Fems Microbiol Lett* 121: 31-34.
- Agata N., Ohta M., Mori M. And Isobe M. (1995). A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Fems Microbiol Lett*, 129 (1), 17-19.
- Andersson A., Rönner U. And Granum P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?. *Int J Food Microbiol*, 28 (2), 145-155.
- Andersson M. A., Mikkola R., Helin J., Andersson M. C., and Salkinoja-Salonen M. (1998). A novel sensitive bioassay for detection of *Bacillus cereus* emetic toxin and related depsipeptide ionophores. *Appl Environ Microb* 64: 1338-1343.
- Angelidis A. S., Boutsouki P., Papageorgiou D. K. (2010). Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22°C. *Food Microbiol*. 27: 809-818.
- ANSES (2011). Caractéristiques et sources de *Bacillus cereus*. Rapport de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail : 1-4.
- ANSES. (2013). Table Ciqua. Composition nutritionnelle des aliments. Rapport de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement.
- Anzueto M.E. (2014). Spore forming bacteria in the milk Chain: a farm to table approach. dissertations and theses in food science and technology. Paper 45. <http://digitalcommons.unl.edu/foodscidiss/45>.

- Arrêté interministériel du 24 Janvier 1998 modifiant et completant l'arrêté du 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires (1998). Journal officiel de la république Algérienne, JORADP N°35.
- Arthur R.H. et Prashanti K. (2013). Chapter 8, dairy products: cheese and yogurt. Biochemistry of foods (third edition), pages 319-362. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-242352-9.00008-4>.
- Asano S.I., Nukumizu Y., Bando H., Iizuka T. and Yamamoto T. (1997). Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol, 63: 1054-1057.
- Bachmann H.P. (2001). Cheese analogues: A review. Int Dairy J, 11(4), 505-515.
- Bachtarzi N., Amourache L. At Dehkal G. (2015). Qualité du lait cru destiné à la fabrication d'un fromage à pâte molle type camembert dans une laiterie de Constantine (Est Algérien). International journal of innovation and scientific research. Issn 2351-8014 Vol. 17 No. 1 Aug. 2015, Pp. 34-42.
- Bartoszewicz M., Hansen B. M. and Swiecicka I. (2008). The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. Food Microbiol, 25(4), 588-596.
- Beattie S. H. and Williams A. G. (2000). Detection of toxins. Encyclopedia of food microbiology, 1, 141-158.
- Beecher D. J., and Macmillan J. D. (1990). A novel bicomponent hemolysin from *Bacillus cereus*. Infection and immunity, 58(7), 2220-2227.
- Beerens H. et Luquet F.M. (1987). Guide Pratique d'analyse microbiologique des laits et des produits laitiers. Technique et documentation (Lavoisier), Paris. F75384.151.
- Bermúdez-Aguirre D., Dunne C.P. and Barbosa-Canovas G.V. (2012). Effect of processing parameters on inactivation of *Bacillus cereus* spores in milk using pulsed electric fields. Int Dairy J 24(1): 13-21.
- Berthold-Pluta A., Pluta A., and Garbowska M. (2015). The effect of selected factors on the survival of *Bacillus cereus* in the human gastrointestinal tract. Microb Pathogenesis, 82, 7-14.
- Bimbenet, J. J., Duquenoy, A., et Trystram, G. (2007). Génie des procédés alimentaires, 2^{ème} édition. ed, Technique et Ingénierie.
- Blackburn C. W. (2006). Food spoilage microorganisms. CRC Press, Boca Raton.

- Boisard L. (2012). Relations entre mobilité du sodium, libération du sel et des composés d'arôme en bouche et perception de la flaveur : application à des modèles fromagers. Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. 1–329.
- Bottone E.J. (2010). *Bacillus cereus*, A volatile human pathogen. Clin Microbiol Rev. 23: 382-398.
- Boutonnier J.L. (2000). Fabrication du fromage fondu. Techniques de l'ingénieur, F6310: 1-14.
- Buňková L. and Buňka F. (2015). Microflora of processed cheese and the factors affecting it. Crc Cr Rev Food Sci, (Just-Accepted), 00-00. DOI: 10.1080/10408398.2015.1060939
- Byrne B., Dunne G. and Bolton D.J. (2006). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium Perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. Food Microbiol 23(8): 803-808.
- C.C.I.L : Centre Canadien d'Information Laitière (2005). Code national sur les produits laitiers. [Http://Www.Dairyinfo.Gc.Ca/Index_F.Php?S1=Dr-LandS2=CanadaandS3=Ndc-CnplandS4=05-2005](http://www.dairyinfo.gc.ca/index_f.php?S1=Dr-LandS2=CanadaandS3=Ndc-CnplandS4=05-2005). Site Consulté Le 15 Octobre 2016.
- Caric M. et Kaláb M. (1993). Processed cheese products. In Cheese : chemistry, physics and microbiologie, 2nd edition, FOX (P.F.), ed., Chapman and Hall, New York, p. 467-505 (1993).
- Carlin F., and Van Leusden, F. (1998). Quantitative risk analysis of spore-forming bacteria in cooked chilled foods containing vegetables. In 3rd Karlsruhe nutrition symposium European research towards safer and better food.
- Carlin F., Albagnac C., Rida A., Guinebretiere M.H., Couvert O. and Nguyen-The C. (2013). Variation of cardinal growth parameters and growth limits according to phylogenetic affiliation in the *Bacillus cereus* group. Consequences for risk assessment. Food Microbiol 33(1): 69-76.
- Carlin F., Fricker M., Pielaat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salonen M.S., Svensson B., Nguyen-The C and Ehling-Schulz M. (2006). Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. Int J Food Microbiol, 109(1), 132-138.
- Caudrillier J.R.G. (2008). Evaluation et validation des traitements thermiques appliques a une gamme de matériels et de milieux de culture. Thèse de doctorat en médecine vétérinaire, école nationale vétérinaire d'Alfort.
- Ceuppens S., Boon N. and Uyttendaele M. (2013). Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. Fems Microbiol Ecol, 84(3), 433-450.

- Ceuppens S., Rajkovic A., Hamelink S., Van De Wiele T., Boon N., and Uyttendaele M. (2012). Enterotoxin production by *Bacillus cereus* under gastrointestinal conditions and their immunological detection by commercially available kits. *foodborne pathogens and disease*, 9 (12), 1130-1136.
- Chambre M. et Daurelles J. (1997). Le fromage fondu. In: Eck A. et Gillis J. C. (Coordinateurs). *Le fromage*. Paris: Technique et documentation Lavoisier, 3rd Ed, pp. 691–708.
- Chen C.Y., Wang Y.H. and Huang C. J. (2004). Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus Circulans* Chia Gene. *Can J Microbiol*, 50(6), 451-454.
- Chen L.D.R.M., Daniel R.M. and Coolbear T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int Dairy J*, 13(4), 255-275.
- Choma C., Guinebretière M.H., Carlin F., Schmitt P., Velge P., Granum P.E. and Nguyen-The C. (2000). Prevalence, Characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *J Appl Microbiol*, 88, 617-625.
- CIQUAL (2013). Table CIQUAL; Composition nutritionnelle des aliments. Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail. <https://pro.anses.fr/tableciqual/index.htm>. Site consulté le 15 octobre 2016.
- Clavel T., Carlin F., Lairon D., Nguyen-The C. and Schmitt P. (2004). Survival of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in acid media simulating human stomach. *J Appl Microbiol* 97: 214-219.
- CNIS : Centre national de l'informatique et des statistiques d'Alger (2015). Statistiques d'importation du cheddar, Algérie. Informations consultées le 02 Mars 2016.
- CNRC : Centre national du registre du commerce Algérien. (2015). Statistique de nombre de fromageries au territoire national Algérien. Informations reçue le 27 Avril 2016.
- Codex Alimentaire (1978) : Norme codex pour le fromage fondu et le fromage fondu pour tartine portant un nom de variété (Codex Stan A-08 (a)-1978), et norme codex pour les préparations à base de fromage fondu (process (ed) cheese food and process (ed) cheese spread) (Codex Stan A-08 (c)-1978).
- Codex Alimentaire (2015). Projet de norme générale pour le fromage fondu (étape 6), CL 2015/34-MMP décembre 2015.
- Colak B. Y. (2014). Utilisation du caséinate de sodium pour la fabrication de films actifs pour l'emballage alimentaire : étude des propriétés barrières aux gaz, de l'activité antimicrobienne et de la biodégradabilité (Doctoral dissertation, université Jean Monnet-Saint-Etienne).

- Considini T., Noisuwan A., Hemar Y., Wilkinson B., Bronlund J., and Kasapis S. (2011). Rheological investigations of the interactions between starch and milk proteins in model dairy systems: a review. *Food Hydrocolloid*, 25, 2008–2017.
- Coroller L., Leguerinel I., Mettler E., Savy N. and Mafart P. (2006). General model based on two-mixed weibull distributions of bacterial resistance, for describing various shapes of inactivation curves. *Appl Environ Microb.* 72 (10): 6493-6502.
- Couvert O. (2002). Prise en compte de l'influence du ph dans l'optimisation des traitements thermiques (Doctoral Dissertation, Brest).
- Couvert O., Leguerinel I., and Mafart P. (1999). Modelling the overall effect of pH on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol.* 49:57±52.
- Crédoc, Cahier de la recherche (2013). CCAF, Tris spécifiques BEL.
- Da Silva, D. F., de Souza Ferreira, S. B., Bruschi, M. L., Britten, M., and Matsumoto-Pintro, P. T. (2016). Effect of commercial konjac glucomannan and konjac flours on textural, rheological and microstructural properties of low fat processed cheese. *Food Hydrocolloid*, 60, 308-316.
- Daly D.F.M., Mcsweeney P.L.H. and Sheehan J. J. (2012). Pink discolouration in commercial cheese : a review. *Dairy Sci. Technol.* 92: 439-453.
- Dantas Cavalcante A. (1995). Influence des facteurs de composition sur les propriétés texturales d'un fromage fondu de «Type Requeijão». Thèse de doctorat dissertation. Institut national polytechnique de lorraine, Vandoeuvre-Les-Nancy.
- De Jonghe V., Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K., Herman L., De Vos P. and Heyndrickx, M. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. *Int J Food Microbiol*, 136 (3), 318-325.
- De Vries M. C., Vaughan E. E., Kleerebezem M. Et De Vos W. M. (2006). *Lactobacillus Plantarum*-Survival, Functional and Potential Probiotic Properties In The Human Intestinal Tract. *Int Dairy J*, 16(9), 1018-1028.
- Debry G. (2001). Lait, nutrition et santé (Ed.) Tec et doc Lavoisier. Paris, France, Pp. 45-84.
- Décret n° 2013-1010 du 12 novembre 2013 modifiant le décret no 2007-628 du 27 avril 2007 relatif aux fromages et spécialités fromagères.
- Diamantino I.M., et Penna A.L.B. (2011). Efeito da utilização de substitutos de gordura em queijos light. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 70, 258–267.
- Dimitreli G., Thomareis A.S. and Smith P.G. (2005). Effect of emulsifying salts on casein peptization and apparent viscosity of processed cheese. *Int J Food Eng*, 1(4), p. 1-17

- Drobniewski F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. Clin Microbiol Rev, 6(4), 324-338.
- Eck A., et Gillis J. C. (1997). Le Fromage. Paris : Technique et documentation Lavoisier, 3rd Ed.
- Eck A. et Gillis J.C. (2006). Le Fromage de la science a l'assurance qualité, fromage fondu. Tec et doc. Ed: Lavoisier. 3^{ème} Edition Paris. Pp : 635-765.
- Eckner K. F., Dustman W. A., and Ryś-Rodriguez A. A. (1994). Contribution of composition, physicochemical characteristics and polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. J Food Protect, 57(4), 295-300.
- EFSA: European Food Safety Authority (2010). Scientific opinion on lactose thresholds in lactose intolerance and galactosaemia. EFSA J;8(9):1777.
- EFSA: European Food Safety Authority (2016). Scientific opinion. risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other bacillus spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA panel on biological hazards (BIOHAZ). Doi: 10.2903/J.Efsa.2016.4524.
- Ehling-Schulz M.; Svensson, B.; Guinebretière M. H.; Lindbäck T.; Andersson M.; Schulz A.; Fricker, M.; Christiansson A.; Granum P. E.; Martlbauer E.; Nguyen-The C.; Salkinoja-Salonen M. and Scherer S. (2005). Emetic toxin formation of *B.Cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. Microbiology+, 151(1), 183-197.
- Ehling-Schulz, M., Guinebretiere, M. H., Monthán, A., Berge, O., Fricker, M., and Svensson, B. (2006). Toxin gene profiling of enterotoxic and emetic *Bacillus cereus*. Fems Microbiol Lett, 260 (2), 232-240.
- Esbelin J. (2009). La proteine Fnr et le systeme a deux composants resde, des regulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus* Thèse de Doctortat dissertation, université d'Avignon.
- Esteban M. A. and Marcos A. (1989). Chemical prediction of water activity in processed cheese. J Dairy Res, 56(04), 665-668.
- Fagerlund A., Lindbäck T. and Granum P.E. (2010). *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and cytk are secreted via the sec translocation pathway. BMC Microbiol 10 (1), 1.
- Fagerlund A., Lindbäck T., Storset A.K., Granum P.E. and Hardy S.P. (2008). *Bacillus cereus* Nhe is a pore-forming toxin with structural and functional properties similar to the Clya (Hlye, Shea) family of haemolysins, able to induce osmotic lysis in epithelia. Microbiology+, 154: 693-704.

- Fagerlund A., Ween A., Lund T., Hardy S.P. and Granum P.E. (2004). Genetic and functional analysis of the CytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology+*, 150: 2689-2697.
- Favier J.C., Luquet F.M. et Bonjean-Lincrowski Y. (1986). Eléments de composition des fromages. *Laits et produits laitiers : vache, brebis, chèvre*, 3.
- Felicio T. L., Esmerino E. A., Cruz A. G., Nogueira L. C., Raices R. S. L., Deliza R., Bolini H.M.A. and Pollonio, m. a. r. (2013). Cheese. What is its contribution to the sodium intake of Brazilians? *Appetite*, 66, 84–88.
- Fernández-No I. C., Guarddon M., Böhme K., Cepeda A., Calo-Mata P., and Barros-Velázquez J. (2011). Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiol*, 28(3), 605-610.
- Ferrão L. L., Silva E. B., Silva H. L. A., Silva R., Mollakhalili N., Granato D., Freitas M.Q., Silva M.C., Raices R.S.L., Padilha M.C., Zacarchenco P.B., Barbosa M.I.M.J., Mortazavian A.M., Cruz A.G. (2016). Strategies to develop healthier processed cheeses: reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. *Food Res Int*, 86, 93-102.
- Finlay W.J., Logan N.A. and Sutherland A.D. (2000). *Bacillus cereus* produces most emetic toxin at lower temperatures. *Lett Appl Microbiol*. 31: 385-389.
- Foegeding E. A., Çakir E., and Koç H. (2010). Using dairy ingredients to alter texture of foods: Implications based on oral processing considerations. *Int Dairy J*, 20,562-570.
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., and Mcsweeney P. L. (2017a). Processed cheese and substitute/imitation cheese products. In *fundamentals of cheese science* (Pp. 589-627). Springer Us.
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., and Mcsweeney P. L. (2017b). Cheese as an ingredient. In *fundamentals of cheese science* (Pp. 629-679). Springer Us.
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., and Mcsweeney P. L. (2017c). Microbiology of cheese ripening. In *fundamentals of cheese science* (Pp. 333-390). Springer Us.
- Frayssinet C. et Fremy J. M. (1991). Dosage des mycotoxines. *Techniques d'analyses dans les industries agroalimentaires : analyse des constituants alimentaires*. vol :(4) 2^{ème}ed coordonnateur : J. I. Multon. Lavoisier. Tec. Doc. Paris.
- Furtado M.M. (2005). Main problems of cheese: causes and prevention. *Fonte comunicações E Editora*. São Paulo, Sp, Brazil.
- Gaillard S. (2003). Modélisation de la thermorésistance, de la viabilité et du comportement a la recroissance de *Bacillus cereus* en fonction de la température, du pH et de l'activité

- aqueuse. Thèse de doctorat, mention Microbiologie. Université de Bretagne Occidentale.
- Gaillard S., Leguerinel I. and Mafart P. (1998). Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. Food Microbiol.15: 625-630.
- Gawehn K. (1988). D (-) Lactate. In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer Hu, Ed.) 3rd Ed., Vol. VI, Pp. 582-588, Vch publishers (Uk) Ltd., Cambridge, Uk.
- Ghosh S. and Setlow P. (2009). Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. J Bacteriol, 191(6), 1787-1797.
- Gitahi N.J., Ombui J.N., Nduati D.W., Gicheru M.M. (2009). Genetic characterisation of food borne *Bacillus cereus* strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay. International journal of integrative biology, 5 (2): 82-86.
- Glass K., and Doyle M.E. (2013). Fri food safety review: safety of processed cheese. FRI food safety review, food research institute, university of Wisconsin. Madison: Fri Briefings. Retrieved from: http://fri.wisc.edu/docs/pdf/ProcCheese_may2005_v2.pdf.
- Gómez-Torres N., Ávila M., Gaya, P., and Garde, S. (2014). Prevention of late blowing defect by reuterin produced in cheese by a *Lactobacillus reuteri* adjunct. Food Microbiology, 42, 82-88.
- Gómez-Torres N., Garde S., Peiroten A., and Avila M. (2015). Impact of *Clostridium* Spp. on cheese characteristics: microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. Food Control, 56, 186-194.
- González I., Lopez M., Martinez S., Bernardo A., and González J. (1999). Thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores formed at different temperatures. Int J Food Microbiol, 51(1), 81-84.
- Gouet P. et Bergere J.L. (1973). Ensilage et gonflement butyrique des fromages. Fourrages, 56-89.
- Granum P.E. (2007). *Bacillus cereus* In: Food Microbiology: Fundamentals and frontiers, 3rd Ed. Edited by Doyle M.P. and Beuchat L.R. 3rd Edition, Pp. 445-455, ASM Press, ISBN 978-1-55581-407-6, Washington, DC.
- Granum P.E. and Lund, T. (1997). *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. Fems Microbiol Lett, 157(2), 223-228.
- Granum P.E., O'sullivan K. and Lund T. (1999). The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. Fems Microbiol Lett, 177: 225-229.

- Guinebretière M. H., Auger S., Galleron N., Contzen M., De Sarrau B., De Buyser M. L., Lamberet G., Fagerlund A., Granum P. E., Lereclus D., De Vos P., Nguyen-The C. And Sorokin A. (2013). *Bacillus Cytotoxicus* Sp. Nov. Is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Micr*, 63(1), 31-40.
- Guinebretière M. H., Thompson F. L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Birgitta S., Vincent S., Nguyen-The C., Heyndrickx M. and De Vos, P. (2008). Ecological diversification in the *Bacillus cereus* group. *Environ Microbiol*, 10(4), 851-865.
- Guinebretière M.H., Broussolle V. and Nguyen-The N. (2002). Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* 40: 3053-3056.
- Guinebretière M.H., Velge P., Couvert O., Carlin F. and Debuyser M.L. (2010). Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (groups i to vii) rather than species affiliation. *J Clin Microbiol* 48(9): 3388-3391.
- Guinebretière S. (2001). Nano-capsules par émulsion-diffusion de solvant: obtention, caractérisation et mécanisme de formation. These de doctorat, (Dissertation, Lyon 1).
- Guinee T. P., Carić M. and Kalab M. (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. *cheese: chemistry, physics and microbiology*, 2, 349-394.
- Guinee T. P., O’Kennedy B. T. and Kelly P. M. (2006). Effect of milk protein standardization using different methods on the composition and yields of cheddar cheese. *J Dairy Sci* 89(2), 468-482
- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire. Technique et Ingénierie. Agro-alimentaire.* ISBN. 2100036661, 9782100036660. Dunod.652 Pages.
- Guiraud J.P. (2012). *Microbiologie alimentaire. Industries Agro-alimentaires.* ISSN 1633-8456. ISBN 2100570080, 9782100570089, Dunod.696 Pages.
- Hardy S.P., Lund T. and Granum P.E. (2001). Cytotoxic toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *Fems Microbiol Lett* 197: 47-51.
- Hauerlandová I., Lorencová E., Buňka F., Navrátil J., Janečková K. and Buňková L. (2014). The influence of fat and monoacylglycerols on growth of spore-forming bacteria in processed cheese. *Int J Food Microbiol*, 37–43, 182–183.

- Haug T.M., Sand S.L., Sand O., Phung D., Granum P.E. and Hardy S.P. (2010). Formation of very large conductance channels by *Bacillus cereus* Nhe in vero and Gh(4) Cells identifies Nhea + B As the inherent pore-forming structure. *J Membr Biol* 237: 1-11.
- Heinrichs J.H., Beecher D.J., Macmillan J.D. and Zilinskas B.A. (1993). Molecular cloning and characterization of the Hbla gene encoding the b component of hemolysin bl from *Bacillus cereus*. *J Bacteriol* 175: 6760-6766.
- Henning D., Baer R., Hassan A. and Dave R. (2006). Major advances in concentrated and dry milk products, cheese, and milk fat-based spreads. *J Dairy Sci* 89(4): 1179-1188.
- Herr B. (2011). Additives in dairy foods. Types and functions of additives in dairy products (1Th 636 ed.). Leatherhead: Leatherhead Food Research.
- Heyndrickx M., and Scheldeman P. (2008). Bacilli associated with spoilage in dairy products and other food. In Applications and systematics of Bacillus and relatives. Chapter 6. In book: Applications and Systematics of Bacillus and Relatives, pp.64 - 82. DOI: 10.1002/9780470696743. Chap6.
- Heyndrickx, M. (2011). The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. Applied and environmental soil science, 2011.
- Hornstra L., De Vries Y. P., De Vos W. M., Abee T. and Wells-Bennik M. H. J. (2005). Gerr, A novel ger operon involved in L-Alanine and inosine-initiated germination of *Bacillus cereus* ATCC 14579. *Appl Environ Microb* 71 (2): 774-781.
- ISO 7932 (2004), Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*-Colony count technique at 30°C. ISO standard, 7932.
- Jääskeläinen, E.L. (2008). Assessment and control of *B.cereus* emetic toxin in food. Helsinki University, Finland, PhD thesis. <https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/33621/assessme.pdf?sequence=1>
- Jeantet R., Brulé G. et Delaplace G. (2011). Génie des procédés appliqué à l'industrie laitière. Lavoisier.
- Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J. And Mahillon J. (2003). The hidden ifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. Mini review in *Environ Microbiol* 5: 631-640.
- Jeßberger N., Dietrich R., Bock S., Didier A. and Märtlbauer E. (2014). *Bacillus cereus* Enterotoxins act as major virulence factors and exhibit distinct cytotoxicity to different human cell lines. *Toxicon*, 77, 49-57.

- Kahraman T., Ozmen G., Ozinan B., Goksoy E.O. (2010). Prevalence of salmonella spp. and listeria monocytogenes in different cheese type produced in turkey. Br. Food J. 112: 1230-1236.
- Kfoury M., Mpagana M., and Hardy J. (1989). Influence de l'affinage sur les propriétés rhéologiques du camembert et du saint-paulin. Le lait, 69 (2), 137-149.
- Khanipour, E., Flint, S. H., McCarthy, O. J., Golding, M., Palmer, J., Ratkowsky, D. A., Ross T and Tamplin, M. (2016). Modelling the combined effects of salt, sorbic acid and nisin on the probability of growth of *Clostridium sporogenes* in a controlled environment (nutrient broth). Food Control, 62, 32-43.
- Kotiranta A, Lounatmaa K. and Haapasalo M. (2000). Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. Microbes Infect 2: 189-198.
- Kumar R. (2012). An investigation into improvement of low fat cheddar cheese by the addition of hydrocolloids. University of Minnesota.
- Kumari S. and Sarkar P.K. (2014). Prevalence and characterization of *Bacillus cereus* group from various marketed dairy products in India. Dairy Sci Technol 94:483–497. Doi 10.1007/S13594-014-0174-5. INRA and Springer-Verlag France 2014.
- Kumari S. and Sarkar P.K. (2016). *Bacillus cereus* hazard and control in industrial dairy processing environment. Food Control, 69, 20-29.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Gardini, F., Vannini, L., and Guerzoni, M. E. (2001). Growth / no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in model systems based on water activity, pH, temperature and ethanol concentration. Food Microbiol, 18(6), 659-668.
- Laouami S. (2012). Métabolisme et toxinogénèse de *Bacillus cereus*: rôles de l'enzyme fermentaire Ldha et du régulateur rédox rex. Thèse de doctorat Dissertation, université d'Avignon.
- Lauverjat C., Déléris I., Tréléa I.C. et al. (2009). Salt and aroma compound release in model cheeses in relation to their mobility. J Agric Food Chem 57:9878–87. doi: 10.1021/jf901446w.
- Lazárková Z., Buňka F., Buňková L., Holáň F., Kráčmar S., Hrabě J. (2011). Effect of different heat sterilization regimes on the quality of canned processed cheese. J. Food Process Eng. 34: 1860-1878.
- Lazárková Z., Buňka F., Buňková L., Valášek P., Kráčmar S., Hrabě J. (2010). Application of different sterilizing modes and the effect on processed cheese quality. Czech J. Food Sci. 28: 168-176.

- Lechner S., Mayr R., Francis K. P., Prüß B.M., Kaplan T., Wießner-Gunkel E., Stewart G.S.A.B. and Scherer S. (1998). *Bacillus Weihenstephanensis* Sp. Nov. Is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1373-1382.
- Legrand P. (2008). Intérêt nutritionnel des principaux acides gras des lipides du lait. *Cholédoc*, P. 105.
- Leguerinel I., Spegagne I., Couvert O., Gaillard S. and Mafart P. (2005). Validation of an overall model describing the effect of three environmental factors on the apparent D-value of *Bacillus cereus* spores. *Int J Food Microbiol* 100(1-3): 223-229.
- Lelievre J., Haker R.R., Taylor M.W. (1990). The role of homogenization in the manufacture of halloumi and mozzarella cheese from recombined milk. *J. Soc. Dairy Technol.* Vol. 43, p.21- 24.
- Leuschner R. G. and Lillford P. J. (2003). Thermal properties of bacterial spores and biopolymers. *Int J Food Microbiol*, 80 (2), 131-143.
- Lindbäck T., Fagerlund A., Rødland M. S. and Granum P.E. (2004). Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology+*, 150 (12):3959-3967.
- Lindbäck T., Hardy S.P., Dietrich R., Sødning M., Didier A., Moravek M., Fagerlund A., Bock S., Nielsen C., Casteel M., Granum P. E. and Märtilbauer E. (2010). Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infect Immun* 78: 3813-3821.
- Logan N.A. (2012). *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol*, 112: 417-429.
- Lopez M., Gonzalez I., Mazas M., Gonzalez J., Martin R. and Bernardo A. (1997). Influence of the recovery conditions on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. *Int J Food Sci Tech* 32, 305–311.
- Lozach E. (2001). Le sel et les microorganismes. Thèse de doctorat en sciences vétérinaire, école nationale vétérinaire de maison alfort.48-51.
- Lücking G., Stoeckel M., Atamer Z., Hinrichs J. and Ehling-Schulz M. (2013). Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *Int J Food Microbiol* 166(2): 270-279.
- Lukanji, Z. (2015). Isolation and molecular characterization of *Bacillus cereus* from cow's raw milk (Doctoral dissertation, university of Fort Hare).
- Lund T., De Buyser M.L. and Granum P.E. (2000). A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol*, 38: 254-261.

- Luu-Thi H., Khadka D.B. and Michiels C.W. (2014). Thermal inactivation parameters of spores from different phylogenetic groups of *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*, 189: 183-188.
- Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bar W. and Krahenbuhl S. (1997). Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New Engl J Med*, 336: 1142-1148.
- Majed R., Faille C., Kallassy M. and Gohar M. (2016). *Bacillus cereus* biofilms-bame, only different. *Frontiers in Microbiology*, 7.
- Marchesseau S., Gastaldi E., Lagaude A. and Cuq J.L. (1995). Influence of pH on protein interactions and microstructure of process cheese. P. 1483-1489. *J. Dairy Sci.* 80.
- Margosch D., Gänzle M. G., Ehrmann M. A. and Vogel, R. F. (2004). Pressure inactivation of bacillus endospores. *Appl Environ Microb*, 70(12), 7321-7328.
- Martinez S., Borrajo R., Franco I., and Carballo J. (2007). Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *Int J Food Microbiol*, 117(2), 223-227.
- Marxen S., Stark T. D., Rüttschle A., Lücking G., Frenzel E., Scherer S., Ehling-Schulz M and Hofmann T. (2015). Depsipeptide intermediates interrogate proposed biosynthesis of cereulide, The emetic toxin of *Bacillus cereus*. *Scientific reports*, 5.
- Mayoraz D.N. (2006). Application de succédanés de souches de "Bacillus" dans différents processus technologiques de réchauffement après détermination de leur résistance à la chaleur par la méthode capillaire. Haute école Valaisanne. Filière technologies du vivant : 27-29.
- Merzougui S., Lkhider M. and Cohen N. (2013). *Bacillus cereus*, un réel problème pour l'industrie agro-alimentaire ? *Bacillus cereus*, a real problem for food industry?. Science lib Editions Mersenne, (5), 130915, ISSN 2111-4706.
- Michelet N., Granum P. E. and Mahillon J. (2006). *Bacillus cereus* enterotoxins, Bi and Tri component cytolysins and other haemolysins. In the comprehensive sourcebook of bacterial toxins. Third Edition. Alouf, J. and Popoff.
- Miller, R. A., Kent, D. J., Boor, K. J., Martin, N. H., and Wiedmann, M. (2015). Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. *J Dairy Sci*, 98(7), 4338-4351.
- Min. com : Ministère Du Commerce Algérien (2015). Rapport relatif aux intoxications alimentaires enregistrées durant l'année 2015, DGROA /DQC/SDNPA. Février 2015.
- Mock M. and Fouet A. (2001). Anthrax. *Annu Rev Microbiol* 55: 647-671.

- Moir A., Corfe B. M. and Behravan J. (2002). Spore germination. *Cell Mol Life Sci*, 59 (3), 403-409.
- Molva C., Sudagidan M. and Okuklu B. (2009). Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in turkey. *Food Control* 20 (9): 829-834.
- Morales P., Calzada J., Rodriguez B., De Paz M., Gaya P. and Nunez M. (2006). Effect of cheese water activity and carbohydrate content on the barotolerance of *Listeria monocytogenes* scott A. *J Food Protect* 69(6): 1328-1333.
- Moravek M., Buerk C., Broussolle V., Guinebretiere M-H., Granum P.E., Nguyen-The C. and Märtlbauer E. (2006). Determination of the toxin potential of *Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *Fems Microbiol Lett* 257: 293-298.
- Mounsey, J. S., and O'Riordan, E. D. (2008). Characteristics of imitation cheese containing native or modified rice starches. *Food Hydrocolloid*, 22, 1160–1169.
- Nagyová, G., Buňka, F., Salek, R. N., Černíková, M., Mančík, P., Grüber, T., and Kuchař, D. 688 (2014). Use of sodium polyphosphates with different linear lengths in the production of 689 spreadable processed cheese. *J Dairy Sci*, 97, 111–22. 690 <http://doi.org/10.3168/jds.2013-7210>.
- Nakamura L.K. (1998). *Bacillus Pseudomycoïdes* Sp. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 48: 1031-1035.
- Nazem, A. M., El-Maghraby, M. M., Amer, A. A., and Hassan, O. M. E. (2010). Quality assessment of different varieties of processed cheese at Alexandria markets. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 30(1), 13-19.
- NF EN ISO 4833-1: 10-2013 : Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes-technique de comptage des colonies à 30°C par la technique d'ensemencement en profondeur.
- Noll F. (1984). In methods of enzymatic analysis (Bergmeyer, H. U., Ed.) 3rd Ed., Vol. Vi, Pp. 582-588, Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach/Florida, Basel.
- Norme Algérienne : NA N°10.96.03 : Méthode d'analyse pour détermination des cendres. Ministère du commerce, CACQE (IDAQUALITEC).
- Norme Algérienne : NA N°10.96.14 : Méthode détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage. Arrêté du 17 Octobre 2013 rendant obligatoire la méthode de détermination de la teneur en matière grasse dans le fromage (JO N°67 /2014).
- Norme Algérienne : NA N°10.96.22 : Méthode d'analyse pour recherche d'un produit amylacé (méthode chimique). Ministère du commerce, CACQE (IDAQUALITEC).

- Norme Algérienne : NA N°10.96.25 : Méthode d'analyse pour détermination de la teneur en eau (méthode par étuvage). Ministère du commerce, CACQE (IDAQUALITEC).
- Notermans, S., and Batt, C. A. (1998). A risk assessment approach for food-borne *Bacillus cereus* and its toxins. *J Appl Microbiol*, 84, 51S.
- Oliveira C. A. F., Franco R. C., Rosim R. E., Fernandes A. M. (2011). Survey of aflatoxin M1 in cheese form the North-east region of Sao Paulo, Brasil. *Food Addit. Contam. Part B-Surveill.* 4: 57-60.
- Oliveira R.B.A, Margalho L.P., Nascimento J.S., Costa L.E.O., Portela J.R., Cruz A.G., and Sant'Ana A.S. (2016). Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: a review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends Food Sci Tech*, 57, 11-19. Doi: 10.1016/J.Tifs.2016.09.008.
- Organji S. R., Abulreesh H. H., Elbanna K., Osman G. E. H. and Khider M. (2015). Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 515-520.
- Oteiza J.M., Giannuzzi L. and Califano A.N. (2003). Thermal inactivation of *Escherichia Coli* O157: H7 and *Escherichia Coli* isolated from morcilla as affected by composition of the product. *Food Res Int* 36 (7): 703-712.
- Ouhib Jacobs O. (2007). Effet de la variation de la source de carbone (glucides) sur la croissance, le métabolisme fermentaire et la toxinogénèse de *Bacillus cereus*. Thèse de doctorat dissertation, Aix-Marseille 3.
- Palmas F., Cosentino S., Fadda M. E., Deplano M., Mascia V. (1999). Microbial characteristics of Pecorino processed cheese spreads. *Lait* 79: 607-613.
- Palop A., Mañas P., and Condón S. (1999). Sporulation temperature and heat resistance of *Bacillus* spores: a review. *J Food Safety*, 19(1), 57-72.
- Pattono D., Grosso A., Stocco P. P., Pazzi M., Zeppa G. (2013). Survey of the presence of Patulin and Ochratoxin a in traditional semi-hard cheeses. *Food Control* 33: 54-57.
- Peña W. E. L., de Andrade N. J., Soares N. F.F., Alvarenga V. O., Junior S. R., Granato, D., Zuniga A.D.G. and de Souza Sant'Ana, A. (2014). Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int Dairy J*, 34(1), 153-158.
- Peng H., Ford, V., Frampton, E. W., Restaino, L., Shelef, L. A., and Spitz, H. (2001). Isolation and enumeration of *Bacillus cereus* from foods on a novel chromogenic plating medium. *Food Microbiol*, 18(3), 231-238.

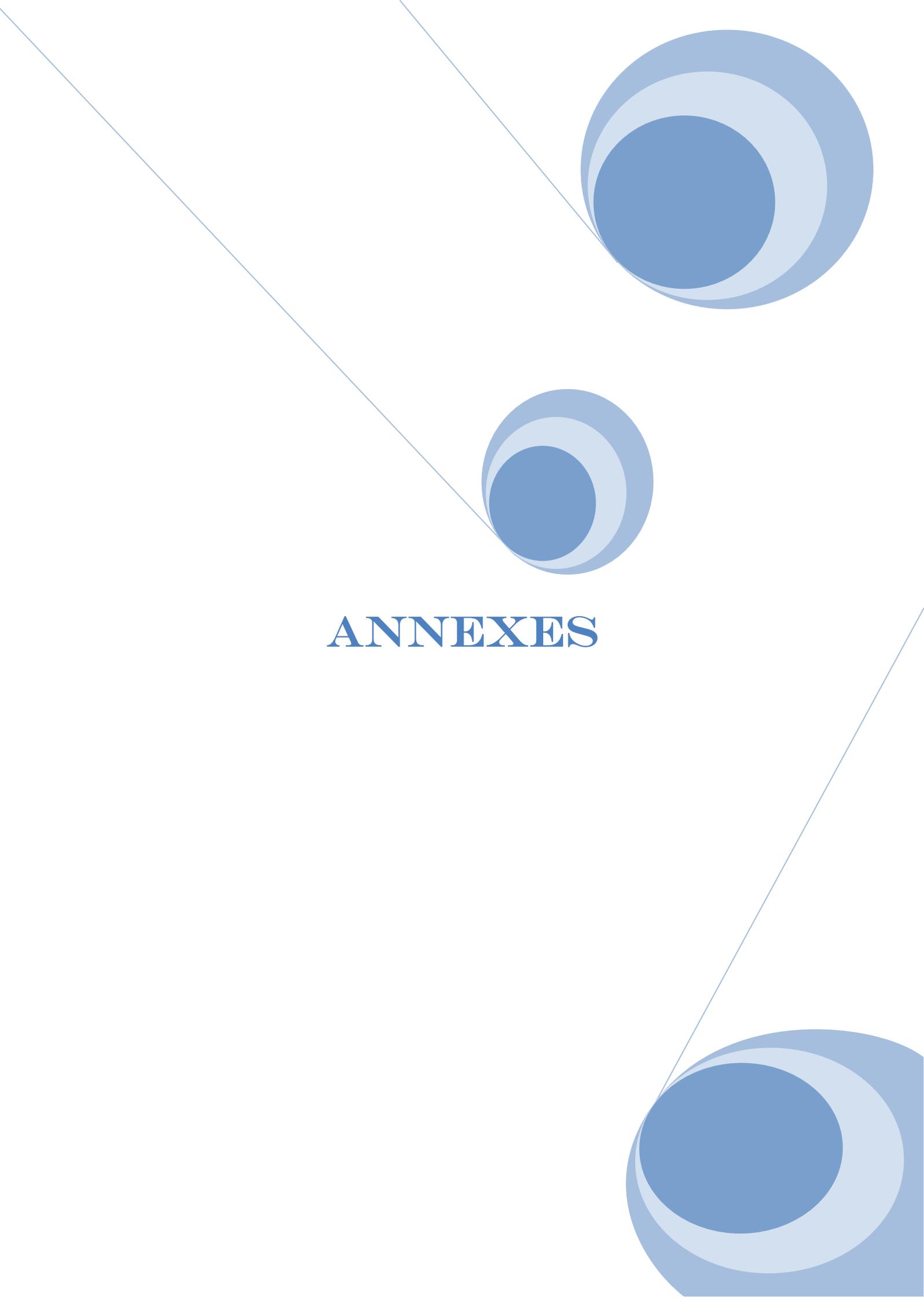
- Petti C. A., Polage C. R. and Schreckenberger P. (2005). The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol*, 43(12), 6123-6125.
- PNNS/PNA (2013). Rapport du groupe PNNS/PNA sur le sel. Ministère de l'agriculture, l'agroalimentaire et de la forêt. Direction générale de l'alimentation. Sous-direction de la politique de l'alimentation. Bureau du pilotage de la politique de l'alimentation.
- Prescott L.M., Harley J.P. et Donald A. (2003). Microbiologie. De Boeck Université, 2^{ème} Edition Française. 128 : 28-29.
- Quintavalla S., and Parolari G. (1993). Effects of temperature, a_w and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study. *Int J Food Microbiol*, 19 (3), 207-216.
- Rajkovic A. (2014). Microbial toxins and low level of foodborne exposure. *Trends Food Sci Tech*, 38(2), 149-157.
- Rajkovic A., Uyttendaele M., Vermeulen A., Andjelkovic M., Fitz-James I., In't Veld P. H., Denon Q., Verhé R. and Debevere J. (2008). Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Lett Appl Microbiol* 46: 536-541.
- Ramarao N. and Sanchis V. (2013). The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review. *Toxins*, 5(6), 1119-1139.
- Ramet J.P. (1985). La fromagerie et les variétés de fromages du bassin méditerranéen (N° FAO APHP-48). FAO, Roma (Italia).
- Richonnet C. (2016). Caractéristiques nutritionnelles des fromages fondus. *Cah Nutr Diet*, 51(1), 48-56.
- Rogers N. R., McMahon D. J., Daubert C. R., Berry T. K., and Foegeding E.A. (2010). Rheological properties and microstructure of cheddar cheese made with different fat contents. *J Dairy Sci*, 93(10), 4565-4576.
- Roustel S. (2014). Fromage fondu : physico-chimie du processus de fonte. *Techniques de l'ingénieur*, F6310: 2: 1-15.
- Roustel S. et Boutonnier J.L. (2015). Fromage fondu : Technologie de fabrication et contrôle qualité. *Techniques de l'ingénieur*, F6311: 1: 1-19.
- Rüegg M., Moor U. And Blanc B. (1977). A calorimetric study of the thermal denaturation of whey proteins in simulated milk ultrafiltrate. *J Dairy Res*, 44(03): 509-520.
- Russell A. (1999). Destruction of bacterial spores by thermal methods. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd Ed. Oxford: Blackwell Science: 640-656.

- Ryu J.H. and Beuchat L.R. (2005). Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *J Food Protect*, 68(12), 2614-2622.
- Sadek Zeinab I, Refaat BM, Abd el- shakour EH, Nayra SH Mehanna and Hassan MS (2015). Potential sources of aerobic and anaerobic spore former bacteria in processed cheese. *RJPBCS* 6(1). Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences, 6, 1830-1837, ISSN: 0975-8585. Page No. 105- 769.
- Salustiano V.C., Andrade N.J., Soares N.F.F., Lima J.C., Bernardes P.C., Luiz L.M.P. and Fernandes P.E. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control* 20(4): 439-442.
- Samapundo S., Heyndrickx M., Xhaferi R. and Devlieghere F. (2011). Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *Int J Food Microbiol*, 150(1), 34-41.
- Samapundo S., Heyndrickx M., Xhaferi R., De Baenst I. and Devlieghere F. (2014). The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus Pumilus* in artificial media and food products. *Int J Food Microbiol* 181: 10-18.
- Sambrook J.F.E.F., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3, 18-1.
- Scheldeman P., Rodriguez-Diaz M., Goris J., Pil A., De Clerck E., Herman L., Logan N. A., De Vos P. and Heyndrickx, M. (2004). *Bacillus Farraginis* Sp. Nov., *Bacillus Fortis* Sp. Nov. and *Bacillus Fordii* Sp. Nov., isolated at dairy farms. *Int J Syst Evol Micr*, 54(4), 1355-1364.
- Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., and Dean D.H., (1998). *Bacillus Thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol R* 62 (3): 775-806.
- Scurrah K.J., Robertson R.E., Craven H.M., Pearce L.E. and Szabo E.A. (2006). Inactivation of *Bacillus* spores in reconstituted skim milk by combined high pressure and heat treatment. *J Appl Microbiol* 101: 172-180.
- Senesi S. and Ghelardi E. (2010). Production, secretion and biological activity of *Bacillus cereus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1690-1703.
- Setlow P. (2003). Spore germination. *Curr Opin Microbiol*, 6(6), 550-556.

- Shaheen R., Svensson B., Andersson M.A., Christiansson A., and Salkinoja-Salonen M. (2010). Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silo tanks. *Food Microbiol*, 27(3), 347-355.
- Shinagawa K., Konuma H., Sekita H. and Sugii, S. (1995). Emesis of rhesus monkeys induced by intragastric administration with the Hep-2 vacuolation factor (Cereulide) produced by *Bacillus cereus*. *Fems Microbiol Lett*, 130(1), 87-90.
- Sim R.B. (1998). *Bacillus cereus* Gastro Enteritis. In. Hausler W. and M. Sussman (Eds.), *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, Vol.3. Arnold, London, Great Britain Pp: 551-556.
- Snrech Tortelier M. (2006). Les produits laitiers allégés : mirage ou panacee? Aspects techniques et nutritionnels (Doctoral dissertation).
- Sołowiej B., Dylewska A., Kowalczyk D., Sujka M., Tomczyńska-Mleko M., and Mleko S. (2016). The effect of pH and modified maize starches on texture, rheological properties and meltability of acid casein processed cheese analogues. *Eur Food Res Technol*, 1-9.
- Stenfors Arnesen L.P., Fagerlund A. and Granum P.E. (2008). From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev*; 32 (4):579-606.
- Swiecickai I., Van Der A. G. and Mahillon J. (2006). Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild animals. *Microbial Ecol* 52: 544-551.
- Szabo R.A., Speirs J.I. and Akhtar M. (1991). Cell culture detection and conditions for production of a *Bacillus cereus* heat-stable toxin. *J Food Protect* 54: 272-276.
- Takeda E., Yamamoto H., Yamanaka-Okumura H., Taketani Y. (2014). Increasing dietary phosphorus intake from food additives: potential for negative impact on bone health. *Adv Nutr*: 5 (1):92-97.
- Tallent S. M., Kotewicz K. M., Strain E. A., and Bennett R. W. (2012). Efficient isolation and identification of *Bacillus cereus* group. *J AOAC Int*, 95(2), 446-451.
- Tamime A. Y. (2011). *Processed cheese and analogues: An overview*. Processed cheese and analogues. Oxford, UK.
- Tamime A. Y., Muir D. D., Shenana M. E., Kalab M., and Dawood A. H. (1999). Processed cheese analogues incorporating fat-substitutes 2. Rheology, sensory perception of texture and microstructure. *LWT-Food science and Technology*, 32 (1), 50-59.
- Tamime A.Y., Kaláb M., Davies G., Younis M.F. (1990). Microstructure and firmness of processed cheese manufactured from cheddar cheese and skim milk powder cheese base. *Food Struct*. vol. 9, p.23–37.

- Te Giffel M. C., Beumer R. R., Granu, P. E., and Rombouts F. M. (1997). Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*, 34(3), 307-318.
- Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizou J. Y. and Buisson Y. (1998). Les infections a *Bacillus cereus*: bacteriologie, clinique et traitement. *Lett Infect*, 99-104.
- Tourasse N. J., Helgason E., Klevan A., Sylvestre P., Moya M., Haustant M., Ole Andreas K., Fouet A Et Kolsto A.B. (2011). Extended and global phylogenetic view of the *Bacillus cereus* group population by combination of Mlst, Aflp, and Mlee genotyping data. *Food Microbiol* 28(2), 236-244.
- Tran S.L., Guillemet E.; Gohar, M.; Lereclus, D.; Ramarao, N. (2010). Cwpfm (Entfm) is a *Bacillus Cereus* potential cell wall peptidase implicated in adhesion, biofilm formation and virulence. *J. Bacteriol.* 192, 2638–2642.
- USDA, National nutrient database for standard reference; 2014.
- Valero, M., Fernandez, P. S., and Salmeron, M. C. (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *Int J Food Microbiol*, 82(1), 71-79.
- Van Der Voort M., García D., Moezelaar R. and Abee T. (2010). Germinant receptor diversity and germination responses of four strains of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol*, 139(1), 108-115.
- Van Netten, P., and Kramer, J. M. (1992). Media for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in foods: a review. *Int J Food Microbiol*, 17(2), 85-99.
- Varunsatian S., Watanabe K., Hayakawa S., Nakamura R. (1983). Effects of Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ and Na⁺⁺ on heat aggregation of whey protein concentrates. *J Food Sci.* vol. 48, 42 p.
- Veisseyre R. (1979). *Technologie du lait : constitution, récolte, traitement et transformation du lait.* Edition la maison rustique, Paris.
- Vierling E. (2003). *Aliments et boissons : filières et produits.* Biosciences et techniques. 2^{ème} édition, Doin, 270 P.
- Weaver C.M., Proulx W.R., Heaney R. (1999). Choices for achieving adequate dietary calcium with a vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* ; 70 (Suppl.), 543s-8s.
- Weiss H. (1921). Note on the viability of the Meningococcus. *J Med Res* 42(4): 321-324.
- Wolfschoon A. F et Vargas O. L. (1978). Reaction mechanism of milk protein determination by formaldehyde titration. *Milch-Wissenschaft*, 33, N°8, 480-482 in techniques d'analyse et de contrôle dans les industries argo-alimentaires. Volume 4. J.L. Multon. 2ème édition (1991). Lavoisier- Tec Et Doc.

- Yared, D. (2014). A study on prevalence, public health significance and the associated risk factors of *Bacillus cereus* on bovine raw milk in selected dairy farms in and around Wolaita Sodo, Bishoftu, Ethiopia (Doctoral Dissertation). College of veterinary medicine and agriculture.
- Yokoyama S. (1999). Molecular bases of color vision in vertebrates. *Genes Genet Syst*, 74 (5), 189-199.
- Zhu K., Didier A., Dietrich R., Heilkenbrinker U., Waltenberger E., Jessberger N., Märklbauer E. Et Benz R. (2016). Formation of small transmembrane pores: an intermediate stage on the way to *Bacillus cereus* non-hemolytic enterotoxin (Nhe) full pores in the absence of Nhea. *Biochem Bioph Res Co*, 469(3), 613-618.

The page features a decorative design with three blue circles of varying sizes. Each circle is composed of concentric layers: a dark blue center, a medium blue ring, and a light blue outer ring. A thin blue line runs diagonally from the top-left towards the bottom-right, passing through the circles. Another thin blue line runs diagonally from the top-right towards the bottom-left, also passing through the circles. The word "ANNEXES" is centered on the page in a dark blue, serif font.

ANNEXES

Annexe 1

Composition des diluants et des milieux de culture

1. Bouillon Trypton-sel-eau (TSE)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	1,0 g
- Chlorure de sodium	8,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

Préparation

- Mettre en solution 9,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

2. Gélose PCA (Plat Count Agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	5,0 g
- Extrait autolytique de levure	2,5 g
- Glucose	1,0 g
- Agar agar bactériologique	12,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : $7,0 \pm 0,2$.

Préparation

- Mettre en suspension 20,5 g de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ajuster le pH à $7,0 \pm 0,2$
- Répartir en flacons de 250 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

3. Gélose Mossel complète

Milieu de base	900mL
Solution de polymyxine B	1mL
Emulsion de jaune d'œuf	100mL

Pour 1 litre de milieu :

Milieu de base :

- Extrait de viande	1g
- Tryptone	10g
- D-mannitol	10g
- Chlorure de sodium	10g
- Rouge de phénol	25mg
- Agar-agar bactériologique	13,5 g

Préparation

- Mettre en suspension 44,5 g de milieu de base déshydraté dans 0,9 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons, à raison de 90 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.
- Dans chaque flacon de 90 mL de milieu de base, ajouter stérilement 10 mL d'émulsion stérile de jaune d'œuf et 1 mL de supplément sélectif Polymyxine dans chaque flacon.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Pétri stériles et effectuer un ensemencement en surface de 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales.

4. Gélose FNA (Fortified Nutrient Agar)

Pour 1 litre de milieu :

- Pastone ou Tryptone	5g
- Chlorure de sodium	3g
- Extrait de viande	3g
- Glucose	0,1g
**Solution métaux 20X	50mL
- Agar Agar bactériologique	20g
- Eau permutée	1000mL

Composition de la solution métaux pour 1000mL

- MnSO ₄ , H ₂ O	0,05g
- CaCl ₂	0,06g
- (NH ₄)SO ₄	0,08g
- MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,008g
- CuSO ₄ , 5H ₂ O	0,005g
- ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0,005g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2.

Préparation

- Mélanger les différents composants du milieu FNA dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Ajuster le pH à 7,0 ± 0,2
- Répartir en flacons de 250 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

5. Tampon TE, 10 X (Tris, Acétate, EDTA)

- Trisma base	48,5 g
- EDTA	7,5 g
- Eau distillée QSP	1000 mL

- Stériliser à l'autoclave à 110°C pendant 20 minutes.
- Ajustement de pH à 8.
- Conservation à température ambiante

6. Solution de lyse

6.1. Solution de base

- Trisma base	0,6 g
- SDS	3 g
- Eau distillée QSP	100 mL

- Conservation à 4°C.

6.2. NaOH 4N

- NaOH	16 g
- Eau distillée QSP	100 mL

Pour **10 mL de solution de base** ajouter **200 µL de NaOH 4N**, ceci constitue la solution de lyse.

- pH final =12,6

7. Gel d'agarose à 1%

- Agarose	0.4 g
- TAE 50X	0.6 mL
- Eau distillée QSP	30g

Annexe 2

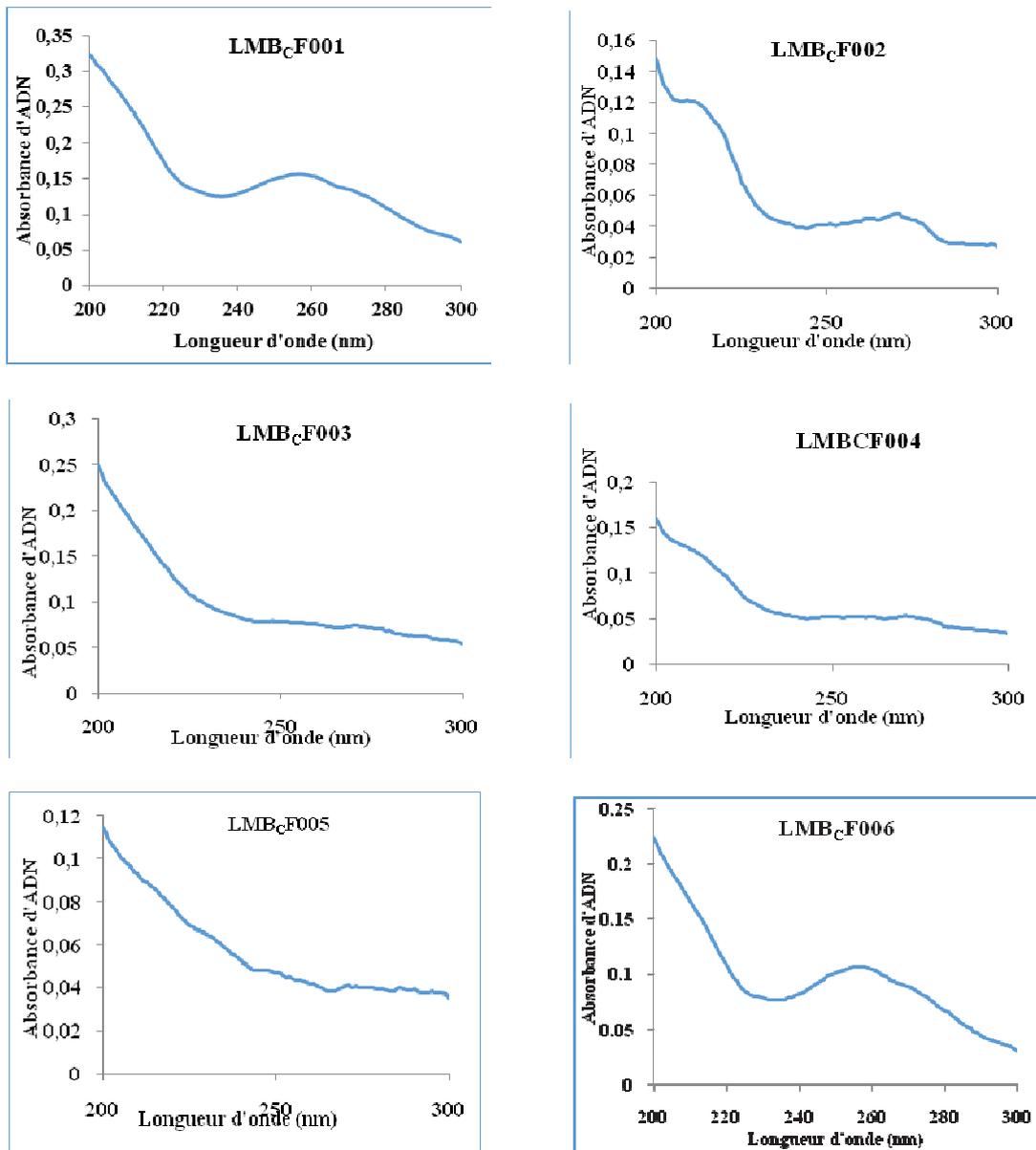


Figure 1 : Spectre d'absorbance d'ADN génomique de spores de *Bacillus cereus* isolées de six marques de fromage fondu Algérien.

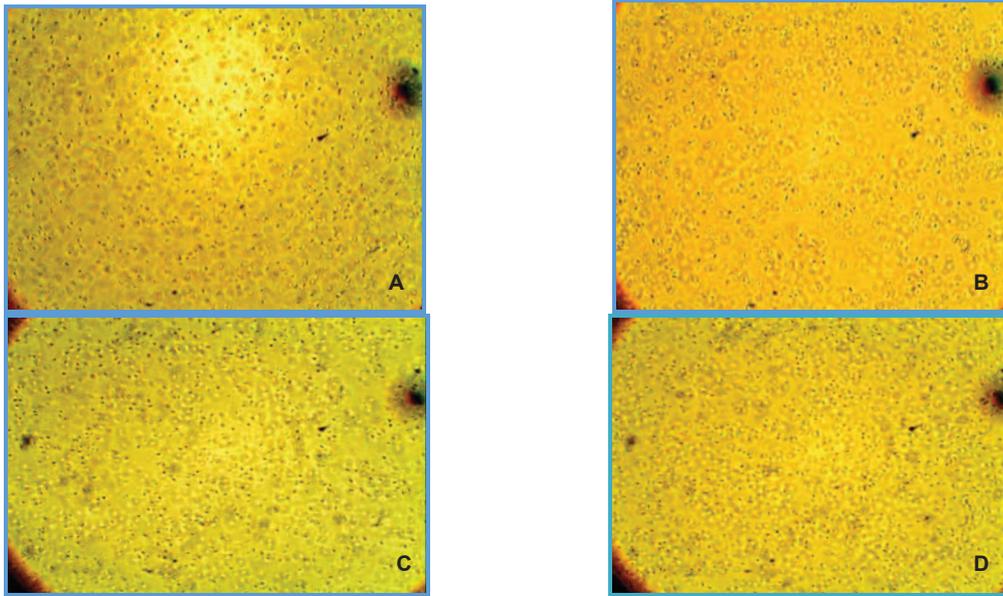


Figure 2: Observation microscopique des spores avant traitement thermique (x12000), A: LMB_C002, B: LMB_C003, C: LMB_C004, D: LMB_C006,

Séquence des souches de *Bacillus cereus* obtenu au sein d'ADRIA développement, Quimper, France.

>SOUCHE 1_PANC

```
NNNNNNNNNNNTTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCA
ATTCTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCT
TGTGATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCC
ACCGGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACT
TGCTGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTC
ATGAGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCG
GTACGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATACATTTCTTCTACGCTC
GGATAAAATAAATAATCTACACCGTTTCTTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCA
CGAGGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTTACAAACACGCTT
AAAAC TACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGT
AAATATCCCATCGTTGGAACAAAACCAA
```

>SOUCHE2_PANC

```
NNNNNNNNNNNTTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCAA
TTCTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCTT
GTGATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCCA
CCGGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACTT
GCTGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTCA
TGAGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCGG
TACGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATACATTTCTTCTACGCTCG
GATAAAATAAATAATCTACACCGTTTCTTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCAC
GAGGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTTACAAACACGCTTA
AAACTACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGTA
AATATCCCATCGTTGGAACAAAACCAA
```

>SOUCHE3_PANC

NNNNNNNNNTATTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCA
ATTCTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCT
TGTGATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCC
ACCGGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACT
TGCTGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTC
ATGAGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCG
GTACGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATAACATTTCTTCTACGCTC
GGATAAAATAAATAATCTACACCGTTTTCTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCA
CGAGGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTACAAACACGCTT
AAAAC TACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGT
AAATATCCCATCGTTGGAACAAAAACCAA

>SOUCHE4_PANC

NNNNNNNNNNNTTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCA
ATTCTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCT
TGTGATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCC
ACCGGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACT
TGCTGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTC
ATGAGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCG
GTACGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATAACATTTCTTCTACGCTC
GGATAAAATAAATAATCTACACCGTTTTCTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCA
CGAGGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTACAAACACGCTT
AAAAC TACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGT
AAATATCCCATCGTTGGAACAAAAACCAA

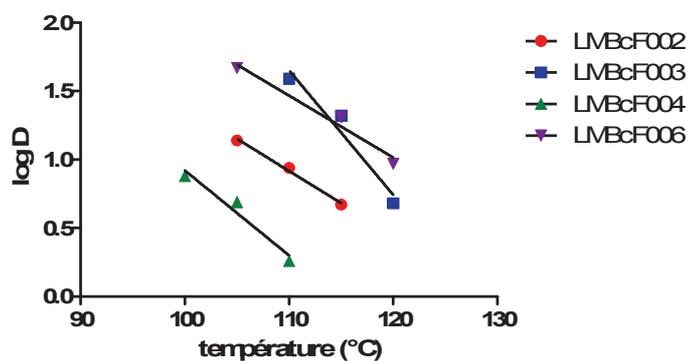
>SOUCHE5_PANC

NNNNNNNNNNNTTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCAA
TTCTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCTT
GTGATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCCA
CCGGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACTT
GCTGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTCA
TGAGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCGG
TACGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATAACATTTCTTCTACGCTCG
GATAAAATAAATAATCTACACCGTTTTCTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCAC
GAGGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTACAAACACGCTTA
AAACTACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGTA
AATATCCCATCGTTGGAACAAAAACCAA

>SOUCHE 6_PANC

NNNNNNNNNTTCTTTTACAAGAGTTGTAATAATTTCTGCATTACGTTCTCCTGCCTCAATT
CTTTCTTTTGCCATACATAGACTGCGGTATAAATGAGGAGCCTCTTTACGCTCTTCTTGT
GATAAATACACGTTACGAGAACTTTTCGCTAATCCATCTTCTTCCCTTACAATATCCACC
GGTACGATTGTAACCGGAATATTAATAATCAGCGACAAATCCTTCAATGACAGCAACTTGC
TGTGCATCTTTCATACCGAAATACGCGTGTGTTGGCAATGTAATATTAATAAGTTTCATG
AGTACAGTCGCAACACCAGCGAAATGACCTGGCCTTTGTTTACCGCATAATACATCGGTA
CGCTTCACAACCTTCTACCGTTGTCGTTTGTCTACTGGATAACATTTCTTCTACGCTCGGA
TAAATAAATAATCTACACCGTTTTCTTTGCTACATTCTCATCTCTATCAATATCACGA
GGGTATCGATCTAAATCTTCATTTCGGCCCAAACCTGTAGTGGATTACAAACACGCTTAA
ACTACAATTTCAATTTCTTCTCTTGCCTTACGTAATAAAGTCGCATGACCTTCATGTA
TATCCCATCGTTGGAACAAAAACCAA

Valeurs de D et Z obtenus

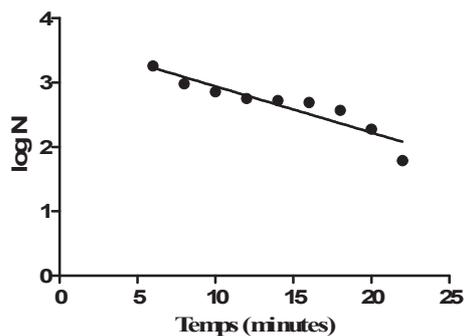


	LMBcF002	LMBcF003	LMBcF004	LMBcF006
Best-fit values				
Slope	-0.0470 ± 0.004041	-0.09100 ± 0.02136	-0.0620 ± 0.01386	-0.04522 ± 0.007988
Y-intercept when X=0.0	6.087 ± 0.4449	11.66 ± 2.458	7.120 ± 1.456	6.442 ± 0.9067
X-intercept when Y=0.0	129,5	128,2	114,8	142,4
1/slope	-21,28	-10,99	-16,13	-22,11
95% Confidence Intervals				
Slope	-0.09835 to 0.004351	-0.3624 to 0.1804	-0.2381 to 0.1141	-0.1467 to 0.05628
Y-intercept when X=0.0	0.4342 to 11.74	-19.57 to 42.90	-11.38 to 25.62	-5.079 to 17.96
X-intercept when Y=0.0	118.9 to +infinity	115.8 to +infinity	-infinity to	120.7 to +infinity
Goodness of Fit				
r ²	0,9927	0,9478	0,9524	0,9697
Sy.x	0,02858	0,1511	0,09798	0,08628
Is slope significantly non-zero?				
F	135,2	18,15	20,02	32,05
DFn, DFd	1.000, 1.000	1.000, 1.000	1.000, 1.000	1.000, 1.000
P value	0,0546	0,1468	0,1400	0,1113
Deviation from zero?	Not Significant	Not Significant	Not Significant	Not Significant
Data				
Number of X values	3	3	3	3
Maximum number of Y replicates	1	1	1	1
Total number of values	3	3	3	3
Number of missing values	3	3	3	3

Valeur de D et Z lors de détermination de thermorésistance dans le bouillon nutritif (GraphPad 6 Software, San Diego, CA, USA).

Souche 2 à 105°C :

temps	logN
6,	3,26
8,	2,98
10,	2,86
12,	2,75
14,	2,72
16,	2,69
18,	2,57
20,	2,28
22,	1,79



Best-fit values

Slope -0.07183 ± 0.01052
 Y-intercept when X=0.0 3.661 ± 0.1569
 X-intercept when Y=0.0 50,97
 1/slope -13,92

95% Confidence Intervals

Slope -0.09671 to -0.04696
 Y-intercept when X=0.0 3.290 to 4.032
 X-intercept when Y=0.0 41.34 to 70.67

Goodness of Fit

r^2 0,8695
 Sy.x 0,1629

Is slope significantly non-zero?

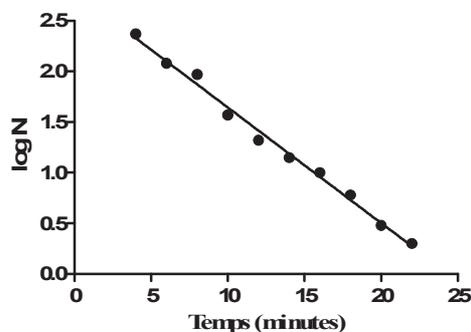
F 46,65
 DFn, DFd 1.000, 7.000
 P value 0,0002
 Deviation from zero? Significant

Data

Number of X values 9
 Maximum number of Y replicates 1
 Total number of values 9
 Number of missing values 0

Souche 2 à 110°C :

temps	logN
4,	2,37
6,	2,08
8,	1,97
10,	1,57
12,	1,32
14,	1,15
16,	1,00
18,	0,78
20,	0,48
22,	0,30



logN

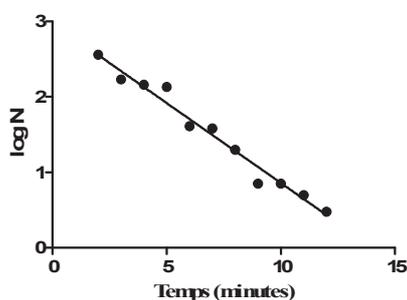
Best-fit values

Slope -0.1141 ± 0.003533
 Y-intercept when X=0.0 2.786 ± 0.05022
 X-intercept when Y=0.0 24,41

1/slope	-8,763
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.1223 to -0.1060
Y-intercept when X=0.0	2.670 to 2.901
X-intercept when Y=0.0	23.55 to 25.38
Goodness of Fit	
r ²	0,9924
Sy.x	0,06418
Is slope significantly non-zero?	
F	1043
DFn, DFd	1.000, 8.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	10
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	10
Number of missing values	0

Souche 2 à 115°C :

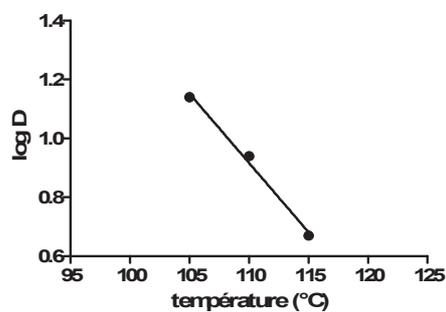
temps	logN
2,	2,56
3,	2,23
4,	2,16
5,	2,13
6,	1,61
7,	1,58
8,	1,30
9,	0,85
10,	0,85
11,	0,70
12,	0,48



Best-fit values	
Slope	-0.2120 ± 0.01141
Y-intercept when X=0.0	2.979 ± 0.08762
X-intercept when Y=0.0	14,05
1/slope	-4,717
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.2378 to -0.1862
Y-intercept when X=0.0	2.781 to 3.178
X-intercept when Y=0.0	13.21 to 15.11
Goodness of Fit	
r ²	0,9746
Sy.x	0,1196
Is slope significantly non-zero?	
F	345,4
DFn, DFd	1.000, 9.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	11
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	11
Number of missing values	0

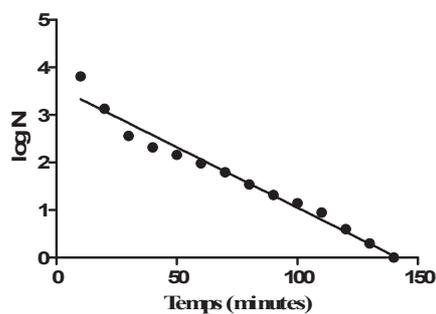
Z de la souche 2 :

température	Log D
105,	1,14
110,	0,94
115,	0,67



	log D
Best-fit values	
Slope	-0.0470 ± 0.004041
Y-intercept when X=0.0	6.087 ± 0.4449
X-intercept when Y=0.0	129,5
1/slope	-21,28
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.09835 to 0.004351
Y-intercept when X=0.0	0.4342 to 11.74
X-intercept when Y=0.0	118.9 to +infinity
Goodness of Fit	
r ²	0,9927
Sy.x	0,02858
Is slope significantly non-zero?	
F	135,2
DFn, DFd	1.000, 1.000
P value	0,0546
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	3
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	3
Number of missing values	0

Souche 3 à 110°C :

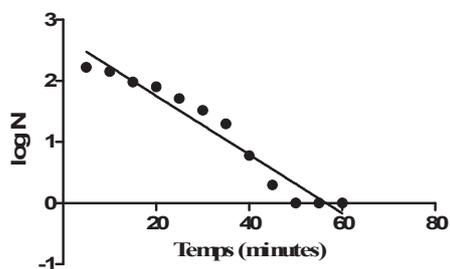


	log N
Best-fit values	
Slope	-0.02531 ± 0.001263
Y-intercept when X=0.0	3.586 ± 0.1075
X-intercept when Y=0.0	141,6
1/slope	-39,50
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.02807 to -0.02256
Y-intercept when X=0.0	3.351 to 3.820

X-intercept when Y=0.0	133.9 to 151.0
Goodness of Fit	
r ²	0,9710
Sy.x	0,1904
Is slope significantly non-zero?	
F	402,0
DFn, DFd	1.000, 12.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	14
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	14
Number of missing values	0

temps	logN
10,	3,81
20,	3,13
30,	2,56
40,	2,32
50,	2,16
60,	1,98
70,	1,80
80,	1,54
90,	1,32
100,	1,15
110,	0,95
120,	0,60
130,	0,30
140,	0,00

Souche 3 à 115°C :



temps	logN
5,	2,22
10,	2,15
15,	1,98
20,	1,90
25,	1,71
30,	1,52
35,	1,30
40,	0,78
45,	0,30
50,	0,00
55,	0,00
60,	0,00

Best-fit values	logN
Slope	-0.0480 ± 0.003584
Y-intercept when X=0.0	2.715 ± 0.1319
X-intercept when Y=0.0	56,56
1/slope	-20,83
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.05598 to -0.04002

Y-intercept when X=0.0	2.421 to 3.009
X-intercept when Y=0.0	52.21 to 62.29
Goodness of Fit	
r ²	0,9472
Sy.x	0,2143
Is slope significantly non-zero?	
F	179,4
DFn, DFd	1.000, 10.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	12
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	12
Number of missing values	0

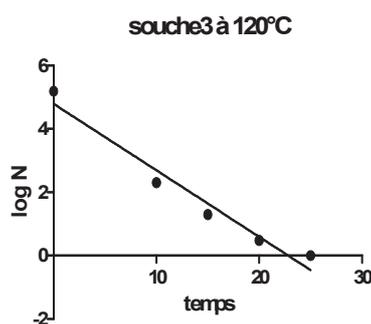
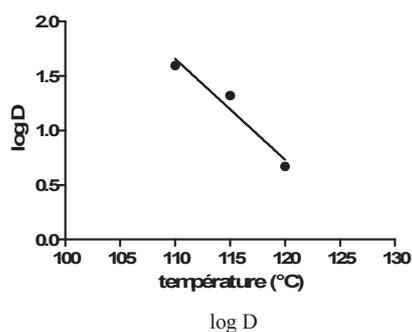


Figure : courbe de destruction thermique de la souche LMBCF002 à 120°C

Best-fit values	
Slope	-0.2099 ± 0.02422
Y-intercept when X=0.0	4.793 ± 0.3980
X-intercept when Y=0.0	22,83
1/slope	-4,763
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.2870 to -0.1329
Y-intercept when X=0.0	3.527 to 6.060
X-intercept when Y=0.0	19.15 to 29.26
Goodness of Fit	
r ²	0,9616
Sy.x	0,4659
Is slope significantly non-zero?	
F	75,12
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	0,0032
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

D_{120°C}=4,76

Z de la souche 3 :



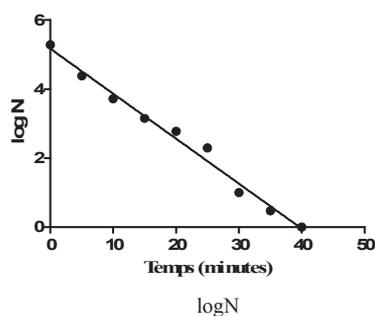
Best-fit values

Slope	-0.0926 ± 0.02159
Y-intercept when X=0.0	11.84 ± 2.485
X-intercept when Y=0.0	127,9
1/slope	-10,80
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.3670 to 0.1818
Y-intercept when X=0.0	-19.73 to 43.42
X-intercept when Y=0.0	115.7 to +infinity
Goodness of Fit	
r ²	0,9484
Sy.x	0,1527
Is slope significantly non-zero?	
F	18,39
DFn, DFd	1.000, 1.000
P value	0,1458
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	3
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	3
Number of missing values	0

température	log D
110,	1,596
115,	1,320
120,	0,670

Souche 4 à 100°C :

temps	logN
0,	5,28
5,	4,38
10,	3,72
15,	3,15
20,	2,78
25,	2,30
30,	1,00
35,	0,48
40,	0,00

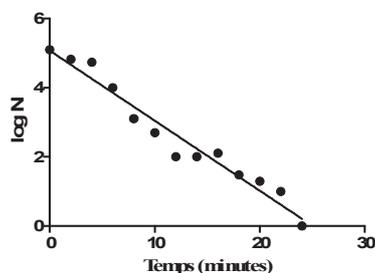


Best-fit values	
Slope	-0.1304 ± 0.005696
Y-intercept when X=0.0	5.173 ± 0.1356
X-intercept when Y=0.0	39,68
1/slope	-7,671
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.1438 to -0.1169
Y-intercept when X=0.0	4.852 to 5.494
X-intercept when Y=0.0	37.44 to 42.35
Goodness of Fit	
r ²	0,9868
Sy.x	0,2206
Is slope significantly non-zero?	
F	523,9
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001

Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

Souche 4 à 105°C :

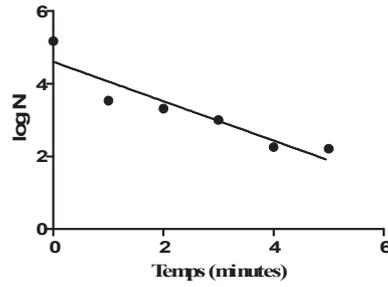
temps	logN
0,	5,090000
2,	4,820000
4,	4,730000
6,	4,000000
8,	3,110000
10,	2,700000
12,	2,000000
14,	2,000000
16,	2,110000
18,	1,480000
20,	1,300000
22,	1,000000
24,	0,000000



Best-fit values	
Slope	-0.2023 ± 0.01283
Y-intercept when X=0.0	5.069 ± 0.1814
X-intercept when Y=0.0	25,06
1/slope	-4,944
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.2305 to -0.1740
Y-intercept when X=0.0	4.669 to 5.468
X-intercept when Y=0.0	23.18 to 27.46
Goodness of Fit	
r ²	0,9576
Sy.x	0,3461
Is slope significantly non-zero?	
F	248,6
DFn, DFd	1.000, 11.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	13
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	13
Number of missing values	0

Souche 4 à 110°C :

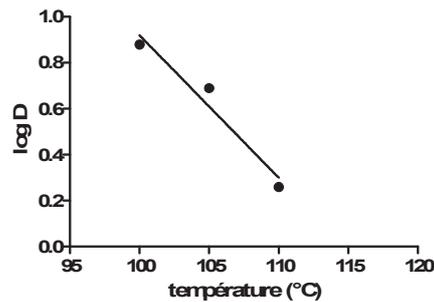
temps	logN
0,	5,170000
1,	3,540000
2,	3,320000
3,	3,000000
4,	2,260000
5,	2,210000



	logN
Best-fit values	
Slope	-0.5417 ± 0.1045
Y-intercept when X=0.0	4.604 ± 0.3163
X-intercept when Y=0.0	8,499
1/slope	-1,846
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.8318 to -0.2517
Y-intercept when X=0.0	3.726 to 5.482
X-intercept when Y=0.0	6.279 to 15.54
Goodness of Fit	
r ²	0,8705
Sy.x	0,4371
Is slope significantly non-zero?	
F	26,88
DFn, DFd	1.000, 4.000
P value	0,0066
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	0

Z de la souche :

température	log D
100,	0,88
105,	0,69
110,	0,26

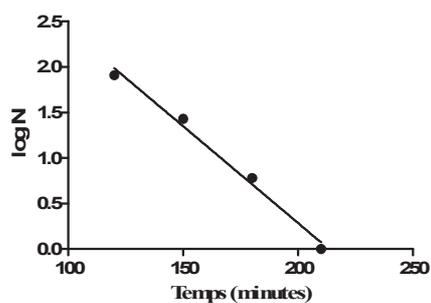


	log D
Best-fit values	
Slope	-0.0620 ± 0.01386
Y-intercept when X=0.0	7.120 ± 1.456
X-intercept when Y=0.0	114,8
1/slope	-16,13
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.2381 to 0.1141
Y-intercept when X=0.0	-11.38 to 25.62
X-intercept when Y=0.0	-infinity to
Goodness of Fit	
r ²	0,9524
Sy.x	0,09798

Is slope significantly non-zero?

F	20,02
DFn, DFd	1.000, 1.000
P value	0,1400
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	3
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	3
Number of missing values	0

Souche 6 à 105°C :



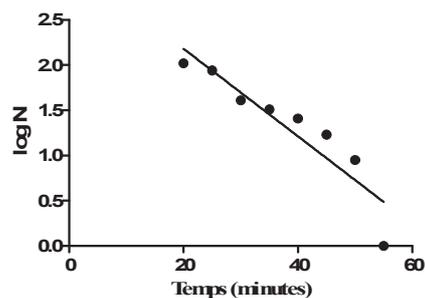
temps	logN
120,	1,91
150,	1,43
180,	0,78
210,	0,00

logN

Best-fit values

Slope	-0.02127 ± 0.001584
Y-intercept when X=0.0	4.539 ± 0.2667
X-intercept when Y=0.0	213,4
1/slope	-47,02
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.02808 to -0.01445
Y-intercept when X=0.0	3.391 to 5.687
X-intercept when Y=0.0	198.3 to 239.7
Goodness of Fit	
r ²	0,9890
Sy.x	0,1063
Is slope significantly non-zero?	
F	180,3
DFn, DFd	1.000, 2.000
P value	0,0055
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	4
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	4
Number of missing values	0

Souche 6 à 115°C :

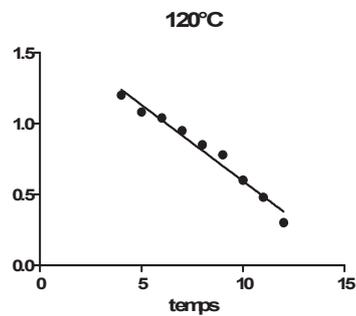


Best-fit values	logN
Slope	-0.04840 ± 0.008246
Y-intercept when X=0.0	3.149 ± 0.3233
X-intercept when Y=0.0	65,05
1/slope	-20,66
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.06858 to -0.02823
Y-intercept when X=0.0	2.358 to 3.940
X-intercept when Y=0.0	55.99 to 85.71
Goodness of Fit	
r ²	0,8517
Sy.x	0,2672
Is slope significantly non-zero?	
F	34,45
DFn, DFd	1.000, 6.000
P value	0,0011
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	8
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	8
Number of missing values	0

temps	logN
20,	2,02
25,	1,94
30,	1,61
35,	1,51
40,	1,41
45,	1,23
50,	0,95
55,	0,00

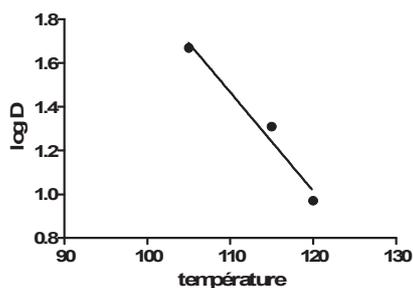
- 120°C :

temps	logN
4	1,20
5	1,08
6	1,04
7	0,95
8	0,85
9	0,78
10	0,60
11	0,48
12	0,30



D=9,30

Z de la souche 6 :



température	log D
105,	1,67
115,	1,31
120,	0,97

	log D
Best-fit values	
Slope	-0.04514 ± 0.007918
Y-intercept when X=0.0	6.433 ± 0.8987
X-intercept when Y=0.0	142,5
1/slope	-22,15
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.1457 to 0.05546
Y-intercept when X=0.0	-4.986 to 17.85
X-intercept when Y=0.0	120.8 to +infinity
Goodness of Fit	
r ²	0,9702
Sy.x	0,08552
Is slope significantly non-zero?	
F	32,51
DFn, DFd	1.000, 1.000
P value	0,1105
Deviation from zero?	Not Significant
Data	
Number of X values	3
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	3
Number of missing values	0

Valeur de D lors de détermination de thermorésistance dans le fromage fondu (GraphPad 6 Software, San Diego, CA, USA).
Les trois souches ensemble : (Log N=f (temps))

	LMBcf002	LMBcf004	LMBcf006	temps	logN
Best-fit values				Too few points	Too few points
Slope	-0.1191 ± 0.02392	-0.2172 ± 0.03868	-0.03585 ± 0.008132		
Y-intercept when X=0.0	3.796 ± 0.3673	3.536 ± 0.3238	3.353 ± 0.4341		
X-intercept when Y=0.0	31,87	16,28	93,53		
1/slope	-8,396	-4,604	-27,89		
95% Confidence Intervals					
Slope	-0.1718 to -0.06646	-0.3015 to -0.1329	-0.05461 to -0.01710		
Y-intercept when X=0.0	2.987 to 4.604	2.831 to 4.242	2.352 to 4.354		
X-intercept when Y=0.0	25.16 to 47.88	13.23 to 22.65	72.67 to 150.9		
Goodness of Fit					
r ²	0,6927	0,7243	0,7085		
Sy.x	0,7452	0,6799	0,7386		
Is slope significantly non-zero?					
F	24,80	31,53	19,44		
DFn, DFd	1.000, 11.00	1.000, 12.00	1.000, 8.000		
P value	0,0004	0,0001	0,0023		
Deviation from zero?	Significant	Significant	Significant		

Data				
Number of X values	13	14	10	
Maximum number of Y replicates			1	1
Total number of values	13	14	10	
Number of missing values	12	11	15	

Souche 3 :

temps	LMBcF003
2,	2,71
4,	2,32
6,	2,20
8,	2,04
10,	1,88
12,	1,52
14,	1,28
16,	1,00
18,	0,48

LMBcF003	
Best-fit values	
Slope	-0.1270 ± 0.008340
Y-intercept when X=0.0	2.984 ± 0.09387
X-intercept when Y=0.0	23,50
1/slope	-7,874
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.1467 to -0.1073
Y-intercept when X=0.0	2.762 to 3.206
X-intercept when Y=0.0	21.54 to 26.13
Goodness of Fit	
r ²	0,9707
Sy.x	0,1292
Is slope significantly non-zero?	
F	231,9
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero? Significant	
Data	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

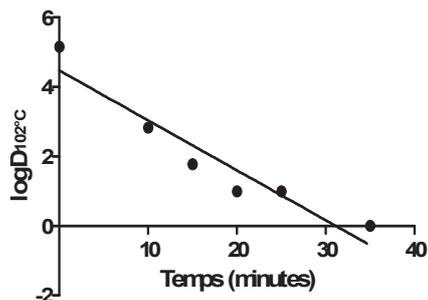
Tableau 2: Valeurs de D estimées (min) pour *Bacillus cereus* dans le fromage fondu.

Souche	Valeur de D _{T°}
LMBcF002	D ₁₁₀ = 8,40
LMBcF003	D ₁₂₀ = 7,87
LMBcF004	D ₁₁₀ = 4,60
LMBcF006	D ₁₁₀ = 27,89

Valeur de D et ZpH lors de variation de pH pour *B. cereus* LMB_cF002 étudié à différents pH au cours du traitement thermique à 102°C obtenu avec GraphPad PRISM 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

pH 7 :

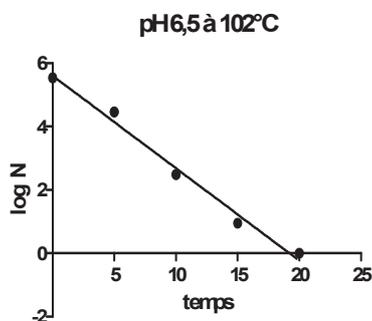
temps	log N
0,	5,16
5,	
10,	2,83
15,	1,78
20,	1,00
25,	1,00
30	
35,	0,00



Best-fit values	log N
Slope	-0.1437 ± 0.02244
Y-intercept when X=0.0	4.476 ± 0.4650
X-intercept when Y=0.0	31,15
1/slope	-6,959
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.2060 to -0.08139
Y-intercept when X=0.0	3.186 to 5.767
X-intercept when Y=0.0	25.28 to 43.35
Goodness of Fit	
r ²	0,9111
Sy.x	0,6095
Is slope significantly non-zero?	
F	40,99
DFn, DFd	1.000, 4.000
P value	0,0031
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	1

• pH 6.5 :

temps	logN
0,	5,54
5,	4,46
10,	2,48
15,	0,95
20,	0,00

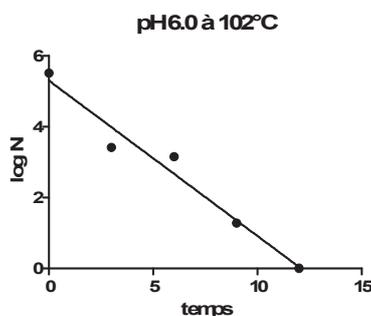


Best-fit values	
Slope	-0.2918 ± 0.01919
Y-intercept when X=0.0	5.604 ± 0.2351
X-intercept when Y=0.0	19,20
1/slope	-3,427
95% Confidence Intervals	

Slope	-0.3529 to -0.2307
Y-intercept when X=0.0	4.856 to 6.352
X-intercept when Y=0.0	17.11 to 22.15
Goodness of Fit	
r ²	0,9872
Sy.x	0,3035
Is slope significantly non-zero?	
F	231,1
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	0,0006
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

• **pH 6.0 :**

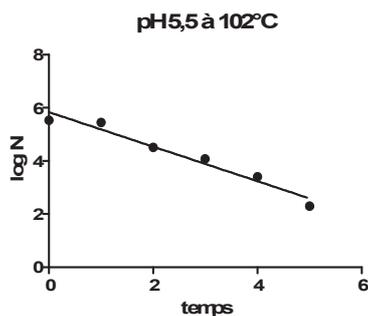
temps	logN
0,	5,51
3,	3,41
6,	3,15
9,	1,28
12,	0,00



Best-fit values	
Slope	-0.4383 ± 0.04762
Y-intercept when X=0.0	5.300 ± 0.3500
X-intercept when Y=0.0	12,09
1/slope	-2,281
95% Confidence Intervals	
Slope	-0.5899 to -0.2868
Y-intercept when X=0.0	4.186 to 6.414
X-intercept when Y=0.0	10.06 to 15.78
Goodness of Fit	
r ²	0,9658
Sy.x	0,4518
Is slope significantly non-zero?	
F	84,72
DFn, DFd	1.000, 3.000
P value	0,0027
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	5
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	5
Number of missing values	0

• **pH 5.5 :**

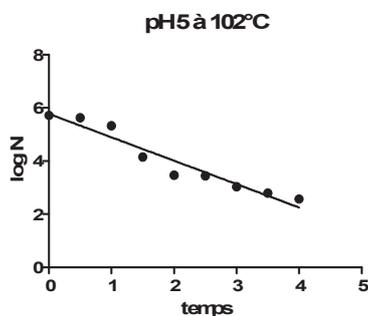
temps	logN
0,	5,53
1,	5,45
2,	4,51
3,	4,08
4,	3,40
5,	2,30



Best-fit values
 Slope -0.6494 ± 0.06658
 Y-intercept when X=0.0 5.835 ± 0.2016
 X-intercept when Y=0.0 8,985
1/slope **-1,540**
 95% Confidence Intervals
 Slope -0.8343 to -0.4646
 Y-intercept when X=0.0 5.276 to 6.395
 X-intercept when Y=0.0 7.485 to 11.63
 Goodness of Fit
 r^2 0,9597
 $Sy.x$ 0,2785
 Is slope significantly non-zero?
 F 95,14
 DFn, DFd 1.000, 4.000
 P value 0,0006
 Deviation from zero? Significant
 Data
 Number of X values 6
 Maximum number of Y replicates 1
 Total number of values 6
 Number of missing values 0

• pH 5.0 :

temps	logN
0,0	5,72
0,5	5,63
1,0	5,32
1,5	4,15
2,0	3,46
2,5	3,44
3,0	3,03
3,5	2,79
4,0	2,57

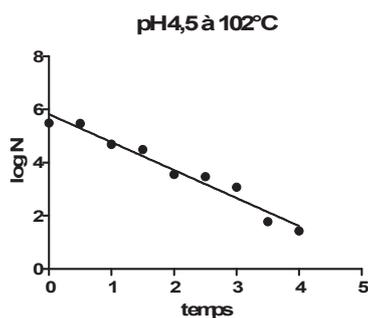


Best-fit values
 Slope -0.8803 ± 0.08779
 Y-intercept when X=0.0 5.773 ± 0.2090
 X-intercept when Y=0.0 6,558
1/slope **-1,136**
 95% Confidence Intervals
 Slope -1.088 to -0.6727

Y-intercept when X=0.0	5.279 to 6.267
X-intercept when Y=0.0	5.646 to 8.006
Goodness of Fit	
r ²	0,9349
Sy.x	0,3400
Is slope significantly non-zero?	
F	100,6
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

• **pH 4.5 :**

temps	logN
0,0	5,49
0,5	5,47
1,0	4,69
1,5	4,49
2,0	3,56
2,5	3,47
3,0	3,08
3,5	1,78
4,0	1,43

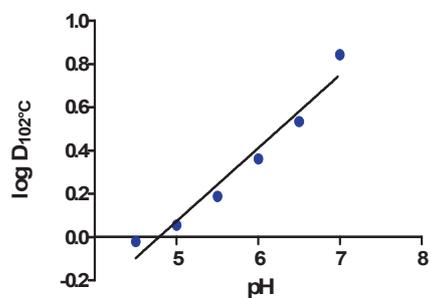


Best-fit values	
Slope	-1.052 ± 0.07835
Y-intercept when X=0.0	5.821 ± 0.1865
X-intercept when Y=0.0	5,535
1/slope	-0,9509
95% Confidence Intervals	
Slope	-1.237 to -0.8664
Y-intercept when X=0.0	5.380 to 6.262
X-intercept when Y=0.0	4.965 to 6.331
Goodness of Fit	
r ²	0,9626
Sy.x	0,3034
Is slope significantly non-zero?	
F	180,2
DFn, DFd	1.000, 7.000
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	9
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	9
Number of missing values	0

• **Valeur de Z_{pH}**

pH	Log D
4,5	-0,022

5,0	0,055
5,5	0,187
6,0	0,360
6,5	0,534
7,0	0,842



Best-fit values

Slope	0.3389 ± 0.03561
Y-intercept when X=0.0	-1.622 ± 0.2070
X-intercept when Y=0.0	4,788
1/slope	2,951
95% Confidence Intervals	
Slope	0.2400 to 0.4377
Y-intercept when X=0.0	-2.197 to -1.048
X-intercept when Y=0.0	4.296 to 5.101
Goodness of Fit	
r ²	0,9577
Sy.x	0,07448
Is slope significantly non-zero?	
F	90,57
DFn, DFd	1.000, 4.000
P value	0,0007
Deviation from zero?	Significant
Data	
Number of X values	6
Maximum number of Y replicates	1
Total number of values	6
Number of missing values	0

Annexe 3

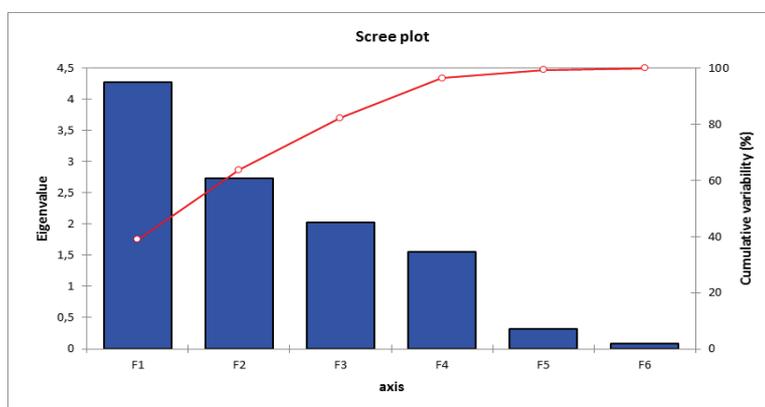
XLSTAT 2010.6.01 - Principal Component Analysis (PCA) -

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
pH	7	0	7	5,160	6,160	5,746	0,299
Aw	7	0	7	0,965	0,981	0,975	0,006
EST	7	0	7	34,040	48,330	40,327	4,833
Teneur en eau (%)	7	0	7	51,670	65,960	59,673	4,833
MG	7	0	7	11,400	22,230	16,024	4,423
MG/EST	7	0	7	30,000	48,000	39,429	7,997
Taux de cendres	7	0	7	2,600	4,000	3,233	0,449
Taux de protéines	7	0	7	10,830	11,500	11,267	0,215
Acide lactique	7	0	7	0,095	0,294	0,187	0,064
Germes totaux	7	0	7	1000,000	29000,000	15857,143	9317,163
<i>Bacillus cereus</i>	7	0	7	50,000	27000,000	7435,714	10894,751

Résultats de l'analyse en composantes principale (ACP)/ Principal Component Analysis (PCA):
Eigenvalues:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Eigenvalue	4,277	2,730	2,030	1,560	0,321	0,082
Variability (%)	38,879	24,820	18,452	14,183	2,921	0,746
Cumulative %	38,879	63,698	82,150	96,333	99,254	100,000



Eigenvectors:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	-0,359	-0,041	-0,353	-0,278	-0,456	-0,198
Aw	-0,116	-0,578	0,110	-0,060	-0,036	0,109
EST	0,311	-0,083	-0,519	0,079	0,151	-0,211
Teneur en eau (%)	-0,311	0,083	0,519	-0,079	-0,151	0,211
MG	0,453	-0,135	-0,147	-0,125	-0,023	0,182
MG/EST	0,428	-0,134	0,125	-0,275	-0,079	0,428
Taux de cendres	-0,071	0,578	-0,021	-0,145	0,307	-0,176
Taux de protéines	-0,026	0,260	-0,259	0,611	-0,493	0,427
Acide lactique	0,068	0,395	-0,156	-0,560	-0,121	0,374
Germes totaux	-0,334	-0,222	-0,341	-0,309	-0,114	0,028
<i>Bacillus cereus</i>	-0,391	-0,090	-0,283	0,106	0,610	0,538

Factor loadings:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	-0,743	-0,068	-0,502	-0,348	-0,259	-0,057
Aw	-0,240	-0,954	0,156	-0,076	-0,020	0,031
EST	0,644	-0,137	-0,739	0,099	0,086	-0,060
Teneur en eau (%)	-0,644	0,137	0,739	-0,099	-0,086	0,060
MG	0,938	-0,223	-0,210	-0,156	-0,013	0,052
MG/EST	0,885	-0,222	0,179	-0,344	-0,045	0,123
Taux de cendres	-0,147	0,955	-0,030	-0,182	0,174	-0,051
Taux de protéines	-0,054	0,430	-0,370	0,763	-0,280	0,122
Acide lactique	0,140	0,652	-0,222	-0,700	-0,069	0,107
Germes totaux	-0,690	-0,367	-0,486	-0,385	-0,065	0,008
<i>Bacillus cereus</i>	-0,809	-0,149	-0,403	0,133	0,346	0,154

Correlations between variables and factors:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
pH	-0,743	-0,068	-0,502	-0,348	-0,259	-0,057
Aw	-0,240	-0,954	0,156	-0,076	-0,020	0,031
EST	0,644	-0,137	-0,739	0,099	0,086	-0,060
Teneur en eau (%)	-0,644	0,137	0,739	-0,099	-0,086	0,060
MG	0,938	-0,223	-0,210	-0,156	-0,013	0,052
MG/EST	0,885	-0,222	0,179	-0,344	-0,045	0,123
Taux de cendres	-0,147	0,955	-0,030	-0,182	0,174	-0,051
Taux de protéines	-0,054	0,430	-0,370	0,763	-0,280	0,122
Acide lactique	0,140	0,652	-0,222	-0,700	-0,069	0,107
Germes totaux	-0,690	-0,367	-0,486	-0,385	-0,065	0,008
<i>Bacillus cereus</i>	-0,809	-0,149	-0,403	0,133	0,346	0,154

Contribution of the variables (%):

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
pH	12,911	0,171	12,426		7,744	20,819	3,925
Aw	1,351	33,355	1,206		0,366	0,128	1,187
EST	9,694	0,684	26,897		0,631	2,292	4,434
Teneur en eau (%)	9,694	0,684	26,897		0,631	2,292	4,434
MG	20,554	1,824	2,172		1,551	0,054	3,320
MG/EST	18,322	1,803	1,572		7,578	0,629	18,340
Taux de cendres	0,504	33,394	0,044		2,115	9,434	3,112
Taux de protéines	0,068	6,780	6,728		37,324	24,323	18,209
Acide lactique	0,458	15,565	2,428		31,407	1,471	13,972
Germes totaux	11,141	4,932	11,632		9,522	1,299	0,079
Bacillus cereus	15,303	0,808	7,997		1,131	37,259	28,988

Squared cosines of the variables:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	
pH	0,552	0,005	0,252		0,121	0,067	0,003
Aw	0,058	0,911	0,024		0,006	0,000	0,001
EST	0,415	0,019	0,546		0,010	0,007	0,004
Teneur en eau (%)	0,415	0,019	0,546		0,010	0,007	0,004
MG	0,879	0,050	0,044		0,024	0,000	0,003
MG/EST	0,784	0,049	0,032		0,118	0,002	0,015
Taux de cendres	0,022	0,912	0,001		0,033	0,030	0,003
Taux de protéines	0,003	0,185	0,137		0,582	0,078	0,015
Acide lactique	0,020	0,425	0,049		0,490	0,005	0,011
Germes totaux	0,476	0,135	0,236		0,149	0,004	0,000
Bacillus cereus	0,654	0,022	0,162		0,018	0,120	0,024

Values in bold correspond for each variable to the factor for which the squared cosine is the largest

Factor scores:

Observation	F1	F2	F3	F4	F5	F6
A	2,353	-1,907	-1,808	0,644	-0,683	-0,060
B	-2,326	-1,416	0,324	1,003	0,544	-0,442
C	-2,861	0,277	-1,762	-0,129	0,200	0,443
D	1,418	2,834	-1,134	-1,004	0,287	-0,294
E	-0,176	-1,475	1,400	-2,535	-0,179	0,028
F	-1,140	1,782	1,632	1,057	-0,896	0,022
G (Témoïn)	2,732	-0,095	1,348	0,964	0,727	0,303

Contribution of the observations (%):

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
A	18,489	19,030	23,020	3,799	20,751	0,626
B	18,072	10,491	0,740	9,214	13,181	34,016
C	27,342	0,403	21,854	0,152	1,780	34,183
D	6,719	42,035	9,050	9,236	3,667	15,007
E	0,103	11,387	13,803	58,858	1,428	0,136
F	4,344	16,607	18,744	10,227	35,709	0,083
G (Témoïn)	24,931	0,047	12,789	8,514	23,484	15,949

Squared cosines of the observations:

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
A	0,415	0,273	0,245	0,031	0,035	0,000
B	0,600	0,222	0,012	0,112	0,033	0,022
C	0,704	0,007	0,267	0,001	0,003	0,017
D	0,161	0,642	0,103	0,081	0,007	0,007
E	0,003	0,205	0,185	0,605	0,003	0,000
F	0,144	0,350	0,294	0,123	0,089	0,000
G (Témoïn)	0,689	0,001	0,168	0,086	0,049	0,008

Values in bold correspond for each observation to the factor for which the squared cosine is the largest

Annexe 4

Extrait de l'arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires7

(N° JORA : 035 du 27-05-1998)

ANNEXE I
CRITERES MICROBIOLOGIQUES RELATIFS A CERTAINES DENREES
ALIMENTAIRES

TABLEAU I
CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES LAITS ET DES PRODUITS LAITIERS
(Fromages règlementés en Algérie).

PRORUITS	I	n	I	c	I	m
	^T		^T		^T	
10. Fromages frais:	I		I		I	
- coliformes	I	5	I	2	I	10
- coliformes fécaux	I	5	I	2	I	1
- <i>Staphylococcus aureus</i>	I	5	I	2	I	10
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
- <i>Listeria monocytogenes</i>	I	5	I	0	I	absence
	I		I		I	
11. Fromages à pâtes molle:	I		I		I	
- coliformes	I	5	I	2	I	10 ²
- coliformes fécaux	I	5	I	2	I	10
- <i>Staphylococcus aureus</i>	I	5	I	1	I	10 ²
- Clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	I	5	I	2	I	1
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
- <i>Listeria monocytogenes</i>	I	5	I	0	I	absence
	I		I		I	
12. Fromages à pâtes dure et demi-dure:	I		I		I	
- <i>Staphylococcus aureus</i>	I	5	I	1	I	10 ²
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
- <i>Listeria monocytogenes</i>	I	1	I	0	I	absence

Tableau 1 : Composition des fromages étudiés.

Marques des fromages fondus	Poids net/16 portions	MG/EST	Composition
Marque A	220g	45%	Fromage, matières grasse végétale, poudre de lait, protéines de lait, sels de fonte (< 20g/Kg), polyphosphate SIN452, Diphosphate SIN450, orthophosphate sodium SIN339, citrates de sodium SIN331 : acide citrique, SIN330, sel de table, eau.
Marque B	240g	45%	Fromage cheddar, beurre, poudre de lait, eau, protéines du lait, lactosérum, sels de table, matière grasse du lait, matière grasse végétale; additifs alimentaires SIN (452,450, 339), phosphore (20g/kg), SIN 331: 330 , SIN508, 407, 410.
Marque C	208g	35%	Cheddar, poudre de lait, matière grasse végétale, protéines du lait, amidon, amidon modifié E1422, épaississant E407; sel de table, sels de fonte, eau, préparation aromatique.
Marque D	240g	48%	Fromage cheddar, fromages, beurre, poudre de lait, eau, protéines du lait, lactosérum, sel de table, matière grasse laitière, additifs alimentaires SIN (452, 450, 341) fixateurs SIN330, neutralisateur d'acidité, Vit D. phosphore (< 20g/kg),
Marque E	200g	35%	Fromage, poudre de lait entier, matière grasse végétale, protéines du lait, eau, polyphosphates, épaississant, acide citrique, citrate.
Marque F	220g	35%	Cheddar, lait en poudre, sels de fonte E450, E452, acide citrique E330, sorbate de potassium E202, amidon (E407,E1422), graisse végétale 38:40, sel de table, eau.