

PROJET DE FIN D'ETUDES

Licence Sciences & Techniques
« Bioprocédés, Hygiène & sécurité alimentaires »

SUIVI DE LA QUALITÉ HYGIÉNIQUE DES CRÈMES GLACÉES



RÉALISÉ PAR : **ZALEGH IMANE**

ENCADRE PAR :

PR. EL GHACHTOULI NAÏMA (FSTF)
ING. KADIRI YAMANI MOUNIA (LRARF)

SOUTENU LE : **16 / 06 / 2015**
DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Pr . **EL GHACHTOULI NAÏMA (FSTF)**
Pr . **ANANOU SAMIR (FSTF)**

Dédicaces

A mes très chers parents,

Le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, dont la prière et la bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Rien au monde ne saurait être assez éloquent pour exprimer ce que vous méritez pour tous ce que vous ne cessez de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Ce travail est le fruit de vos sacrifices.

A mes frères,

Pour votre soutien et encouragements présentent dans tous mes moments d'examens par vos belles surprises sucrées. Vous occupez une place particulière dans mon cœur.

Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir plein de joie, de réussite et de sérénité.

A ma seconde famille,

*A celui que j'aime beaucoup et qui m'a soutenue tout au long de mon parcours mon fiancé **Mouad**, et ma belle-mère qui m'accueilli à bras ouverts dans sa famille.*

En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Je vous dédie ce travail avec ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A mes chers amis,

Narjiss, Lamia, Faiçal.. En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments. En souvenir de tout ce qu'on a vécu ensemble. J'espère de tout mon cœur que notre amitié durera éternellement.

A tous ceux qui me sont chers

Imane Zalegh

Remerciements

Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.

J'exprime mes sincères remerciements à Mr. Lahcen Essaleh le Directeur du « LRARF » d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires pour la réalisation de ce travail.

Je remercie également l'ensemble des ingénieurs de L'Unité Microbiologie Alimentaire pour leur honorable encadrement, Mme Kadiri Yamani Mounia, Mme. LAHLOU Nabila et Mr. Abdelkader Lachhab, j'ai eu le privilège de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos qualités et vos valeurs, votre sérieux, votre compétence et votre sens du devoir.

Ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de Pr. El Ghachtouli Naïma, je la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel dont elle m'a fait bénéficier aimablement, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant ma préparation de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Je suis bien consciente de l'honneur que nous a fait Pr. Samir Ananou de siéger en tant que membre de jury et d'accepter avec grande sympathie d'examiner ce travail. Son jugement m'est autant plus précieux qu'il émane d'une personne qui m'a enseignée.

Mes remerciements s'adressent également au corps professoral et administratif de la « Faculté des Sciences et Techniques Fès » qui en plus de la qualité de l'enseignement qui nous a été dispensé, ont su nous apprendre et nous transmettre certaines de leurs valeurs.

Mes profonds remerciements vont également à toutes les personnes qui m'ont aidés et soutenu de près ou de loin à la réalisation de ce projet

Merci!

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures.....	
Liste des tableaux	
Présentation de l'Organisme de d'accueil	
I. Historique	
II. Activités du LRARF par section	
1. Section Qualité- métrologie.....	
2. Section Hygiène Alimentaire.....	
3. Section santé animale	
III. Organigramme du LRARF.....	
Résumé	
Introduction	1
Partie I : Revue bibliographique.....	2
I. Crèmes Glacées	2
1. Définition et Caractéristiques	2
2. Marché des glaces au Maroc	4
3. Fabrication industrielle	4
4. Fabrication artisanale.....	5
5. Rapport coût/qualité hygiénique.....	5
II. Critères de qualité microbiologique des crèmes glacées.....	6
1. Définition.....	6
2. Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)	7
3. Coliformes Totaux (CT)	8
4. Flore pathogène	8
5. Action des MO dans les aliments	9
III. Incidence sanitaire liée à la consommation des crèmes glacées contaminées	9
1. Maladies d'Origine Alimentaire	10
2. Intoxications Alimentaires liés aux crèmes glacées au Maroc	10
Partie II : Matériel et méthodes	11
I. Échantillons analysés	11
II. Analyses microbiologiques d'évaluation de la qualité des crèmes glacées	11

1.	Préparation des échantillons pour essai	11
2.	Prise d'essai, suspension mère et dilution	11
3.	Dénombrement de FMAT	12
4.	Dénombrement des CT	12
5.	Dénombrement de <i>S. aureus</i>	13
6.	Recherche de <i>Salmonella</i>	13
7.	Recherche de <i>L. monocytogenes</i>	15
Partie III : Résultats et Déclaration de Conformité		18
I.	Lecture de résultats.....	18
II.	Déclaration de conformité.....	20
III.	Conformité et pourcentage des germes responsables de la non-conformité	21
IV.	Causes probables de la non-conformité	22
V.	Discussion	22
Conclusion.....		24
Références bibliographiques.....		
Webographies		
Annexe 1.....		
Annexe 2.....		

Liste des abréviations

AFNOE	: Association Française de la Normalisation	ONSSA	: Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires
BGA	: Brillant-Green-Agar	OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
BP	: Braid Parker	NC	: Non-Conformité
CCM	: Chromatographie sur Couche Mince	PCA	: Plate Count Agar
CG	: Crème Glacée	QH	: Qualité Hygiénique
CAPM	: Centre Anti Poison et de Pharmacovigilance du Maroc	RPF	: Rabbit Plasma Fibrinogen (plasma de lapin et fibrinogène)
CT	: Coliformes Totaux	RVS	: Rappaport Vasiliadis Soja
ED	: Eau Distillé	SLNG	: Solides du Lait Non Gras
EPT	: Eau Peptonée Tamponnée	TIA	: Toxi-Infection Alimentaire
FAO	: Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture)	TIAC	: Toxi-Infection Alimentaire Collective
FMAT	: Flore Mésophile Aérobie Totale	TI	: Toxi-Infection
Glu	: Glucose	T-sel	: Trypton-sel
IA	: Intoxication Alimentaire	TSI	: Triple Sugar Iron
LRARF	: Laboratoire Régional d'analyses et de Recherches de Fès	UFC	: Unité Formant Colonie
L/H	: Litre par Habitant	VRBL	: Violet-Red-Bile-Lactose (géluse lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)
MOA	: Maladies d'Origine Alimentaire	XLD	: Xylose-Lysine-Désoxycholate
MO	: Micro-Organismes		
MKTTn	: Muller et Kauffman		
MS	: Matière Sucrée		

Liste des figures

Figure 1 : Activités de la section hygiène alimentaire.....	9
Figure 2 : Activités de la section santé animale.....	9
Figure 3 : Organigramme du LRARF.....	10
Figure 4 : Structure schématique d'une crème glacée (Boutonnier. 2001).	2
Figure 5 : Aspect la gélose VRBL avant et après incubation	13
Figure 6 : Étapes de préparation d'une galerie API 20E pour identification de <i>Salmonella</i>	15
Figure 7 : Aspect des colonies de <i>L. monocytogenes</i> sur le milieu ALOA et Palcam....	16
Figure 8 : Pourcentage de Conformité et NC et répartition des germes incriminés dans cette dernière	21

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition des mix de la crème glacée (Marshall et Abruckle. 1996).....	3
Tableau 2 : Valeur alimentaire dans une portion de 100 g de crème glacée (Ciquel 2013)	4
Tableau 3 : La microflore recherchée dans une crème glacée selon l'arrêté n°624-04	6
Tableau 4 : Volumes et Températures d'incubation pour chaque milieu	13
Tableau 5 : Résumé de méthodes d'ensemencement, milieux de culture et T°C d'incubation pour : FMAT, CT et <i>S. aureus</i>	16
Tableau 6 : Résumé de méthodes d'ensemencement, milieux de culture et T°C d'incubation pour : <i>Salmonella</i> et <i>L. monocytogenes</i>	17
Tableau 7 : Résultats du dénombrement de la FMAT, des CT, des <i>S. aureus</i> , et la recherche de <i>Salmonella</i> et <i>L. monocytogenes</i> dans les échantillons de crèmes glacées.....	18
Tableau 8 : Moyenne des résultats du dénombrement de : la FMAT, des CT, des <i>S.</i> <i>aureus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>L. monocytogenes</i> dans des échantillons de CG (moyenne de 5 prélèvements)	19
Tableau 9 : Déclaration de conformité des échantillons de crèmes glacées testés	20

Présentation de l'Organisme de d'accueil

I. Historique

Le Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherches de Fès (LRARF) créé en 1981, constitue une structure d'appui incontournable dans la surveillance épidémiologique des maladies infectieuses et transmissibles, ainsi que dans les domaines de la santé animale et le contrôle hygiénique des produits animaux et d'origine animale ainsi que des aliments du bétail. Les résultats d'essai de ce laboratoire doivent être fiables afin d'assurer la crédibilité auprès des clients et des partenaires commerciaux. Pour ceci le laboratoire a fondé depuis 1995 un système d'assurance de qualité à partir de norme EN 45001 et du guide ISO CEI 25.

Cette mise en place du système qualité a connu une actualisation à partir du juin 2006, et la création de l'ONSSA en 2009, qui a lieu suite à la restructuration du Département de l'Agriculture, est venue pour concrétiser une des orientations stratégiques du plan MAROC VERT. La création de l'ONSSA est une opportunité pour un meilleur positionnement des laboratoires au sein d'un dispositif de contrôle officiel.

En 2012, le laboratoire a été accrédité selon la NM ISO/CEI 17025, ce qui lui a permis une reconnaissance internationale de la fiabilité de ses résultats et la crédibilité du système de contrôle et de certification.

Il existe 7 laboratoires régionaux d'analyses et de recherches, répartis sur l'ensemble du territoire national. Chaque laboratoire est constitué de plusieurs services selon le nécessaire.

II. Activités du LRARF par section

1. Section Qualité- métrologie

Section Qualité- métrologie est chargée de la mise en place du système management qualité selon la norme NM ISO 17025.

2. Section Hygiène Alimentaire

Cette section se compose de 2 unités qui assurent le contrôle de la qualité microbiologique et chimique des denrées alimentaires (Autocontrôles et Contrôles officiels) : (Figure 1)

Microbiologie Alimentaire

- Recherche et Dénombrement des germes pour le contrôle microbiologique des aliments tels que le lait et produits laitiers, les produits carnés, les produits de la pêche et de la pisciculture, ainsi que les analyses bactériologiques des eaux utilisées dans l'industrie agro-alimentaire ou dans les élevages avicoles et piscicoles.
- Plan de surveillance : Recherche des résidus dans les viandes ovines par l'activité antibactérienne selon la méthode des 4 boîtes

Chimie- Toxicologie

- Contrôle de la qualité chimique des aliments et recherche de la composition chimique des denrées alimentaires (lait et produits laitiers ; viandes, produits carnés et produits de la pêche ; conserves et semi-conserves ; eaux, aliments des animaux, etc...)
- Recherche toxicologique par CCM
- Recherche des résidus de sulfamides dans les viandes par CCM

Figure 1 : Activités de la section hygiène alimentaire

3. Section santé animale

La section santé animale se compose de 4 unités (Figure 2) :

Diagnostic Bactériologique

- Autopsies des animaux (volailles, lapins, carnivores et petits ruminants)
- Recherche microbiologique à partir de cadavres, d'organes et de produits pathologiques.
- Les principales maladies recherchées sont : les brucelloses, la tuberculose, la para tuberculose, les salmonelles, la pasteurellose, les loques Européenne et Américaine et les différentes septicémies bactériennes
- Réalisations des Antibiogramme.

Parasitologie \ Entomologie

- Recherches et dénombrement des parasites et hémoparasites chez les animaux
- Recherche de la Varroase chez les abeilles

Diagnostic Virologique

- Diagnostic expérimental de la Rage par technique IF
- Préparation des prélèvements destinés aux recherches virologiques

Sérologie- Immunologie

- Diagnostic sérologique des maladies animales d'origine bactérienne ou virales par différentes techniques (Agglutination, Réaction de fixation du complément, ELISA, IDG) : Brucelloses, Paratuberculose, Chlamydie, CAEV, Visna meadi, Blue Tongue, Mycoplasmes aviaires, Salmonelles, Leucose bovine enzootique, Rhinotrachéite bovine infectieuse, Artérite Virale, Equine

Figure 2 : Activités de la section santé animale

III. Organigramme du LRARF

L'ONSSA, est organisé en structures centrales, et régionales et provinciales.

Au niveau du LRARF, on trouve les structures suivantes illustrées sur la figure 3:

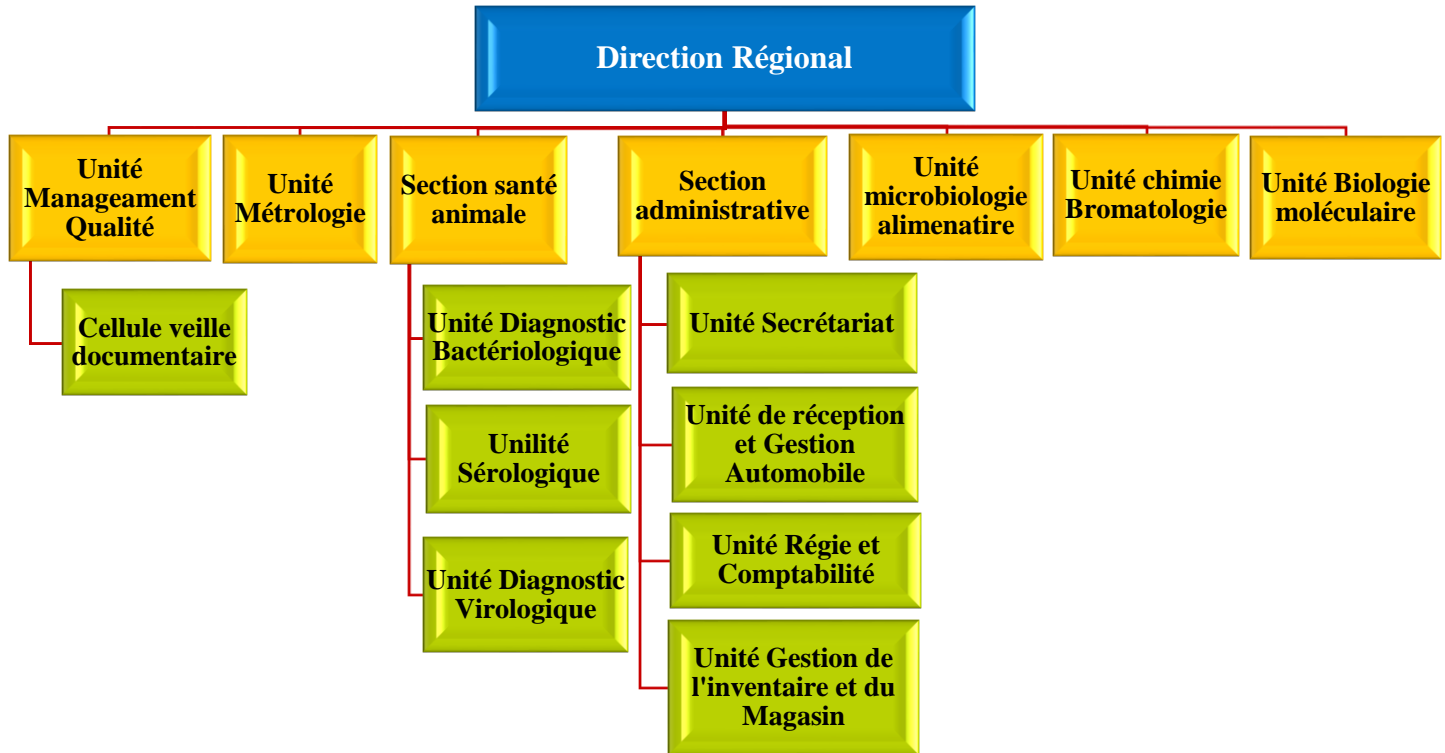


Figure 3 : Organigramme du LRARF

Résumé

L'objectif de notre travail est d'étudier la qualité hygiénique des crèmes glacées survenue au niveau du laboratoire.

Il s'agit d'une étude évaluative portant sur 35 échantillons de crèmes glacées analysées au niveau de l'unité microbiologie alimentaire de Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherche de Fès durant la période Avril 2015 à Mai 2015.

Notre étude est réalisée par des analyses microbiologiques normalisées selon l'arrêté conjoint n°624-04, et normalisées par des normes de qualité des produits alimentaires.

Les tests ont permis de conclure que la charge des *Staphylococcus aureus* est conforme aux critères utilisés cette conformité est enregistré également au niveau de la recherche de *Listeria monocytogenes* et *Salmonella* au niveau de tous les échantillons, par contre l'expression de la flore mésophile aérobie totale et des coliformes totaux est importante dans 34 échantillons des crèmes glacées étudiées, ceci a conduit à une Non-Conformité globale de 99% des échantillons analysés. Cette dernière est partagée entre : 23% de la flore mésophile aérobie totale et les coliformes totaux, 9% de la FMAT dans les échantillons, tandis que 66% est dû aux coliformes totaux.

Non-respect des bonnes pratiques de production, de règles d'hygiènes lors de la préparation, des instructions de nettoyage, non-respect de la température de conservation et la rupture de la chaîne de froid, et l'insuffisance du traitement thermique du mix lors de la préparation de la crème glacée. Sont tous les facteurs qui conduisent à la contamination de ce produit, et peut être pour la suite à des intoxications alimentaire. D'où l'obligation de les évités par l'élaboration des plans de contrôle et de surveillance des chaînes de froid, établir des programmes visant à renforcer l'éducation sanitaire et l'hygiène alimentaire chez les professionnels mais également chez les consommateurs.

Mots clés : Crèmes glacées, qualité hygiénique, flore contaminante, Laboratoire Régional d'Analyses et e Recherche de Fès.

Introduction

Avec l'arrivée de l'été, les crèmes glacées deviennent un produit de consommation vedette pour le plaisir et pour atténuer les grandes chaleurs de l'été.

Contrairement à une idée bien reçue, les pays froids du nord d'Europe sont les plus friands malgré leur climat peu clément, que les pays de la Méditerranée et témoignent d'une consommation étalée sur l'ensemble des saisons, où les chiffres affichent 14 L/H (Jdily. 2008). En Tunisie, la consommation varie de 1 à 3 L/H. Au Maroc, par contre la population semble plutôt en froid avec ce dessert pris surtout pendant la période estivale. La consommation annuelle par habitant reste relativement faible avec 0,35 à 1,5 L/H, selon les différentes estimations des fabricants de glaces artisanales et industrielles. A Rabat, Casablanca ou Marrakech, la moyenne est plus élevée: 2 à 3 L/H (Jdily. 2008). Il est à signaler que les Marocains consomment selon leurs budgets, ils s'approvisionnent souvent auprès d'un distributeur. À ce jour, il n'existe pas de chiffres officiels sur la consommation de glaces au Maroc.

Malgré les avantages liés à la consommation de ce produit agréable au goût et nutritif, celui-ci pose un problème de sécurité alimentaire. Les glaces constituent un milieu favorable à la prolifération des MO, source de transmission de maladies infectieuses, en raison de leur valeur nutritive élevée (Lactose, protéines...) et de leur pH proche de la neutralité (6-7). Ces maladies infectieuses d'origines alimentaires causées par la détérioration des denrées constituent un problème d'une ampleur considérable loin d'être négligé au Maroc.

La sécurité alimentaire, dont la qualité microbiologique des aliments est une composante essentielle, a un rôle évident à jouer dans la prévention des TI. Par voie de conséquence, elle participe à la maîtrise des dépenses de santé, les pertes de productivité liées à l'absentéisme au travail, et une valeur estimative des décès précoces. Pour ceci, un suivi de la QH de ces denrées demeure nécessaire.

C'est dans ce contexte que vient l'intérêt de notre travail réalisé au sein de l'unité de microbiologie alimentaire du LRARF, où nous avons analysé 35 échantillons de crèmes glacées provenant des zones d'activités du laboratoire, pour faire l'objet de notre travail intitulé : **Suivi de La qualité hygiénique des Crèmes Glacées.**

Le rapport de ce travail est présenté comme suit : Tout d'abord une étude bibliographique où nous avons présenté les crèmes glacées de point de vue compositionnel et opérationnel ainsi que les critères microbiologiques gérant leur QH et leur implication dans MOA, la partie matériel et méthodes nous l'avons consacré pour la présentation des méthodes d'analyses microbiologiques effectuées. La dernière partie où nous avons recueilli les résultats des échantillons de crèmes glacées testés et déduit la conformité par rapport à l'arrêté n°624-04 , pour enfin conclure.

Partie I : Revue bibliographique

I. Crèmes Glacées

1. Définition et Caractéristiques

1.1 Définitions

Les crèmes glacées (CG) sont composées d'un mélange d'ingrédients congelés parmi lesquels le lait, le sucre et/ou des produits sucrants, des hydrocolloïdes, des émulsifiants des stabilisants et des produits aromatisants. D'autres ingrédients tels que des colorants, des ovo-produits et des malodextrines peuvent être incorporés. La figure 4 présente une structure schématique de la crème glacée (Mathlouhi et Rogè. Les crèmes glacée).

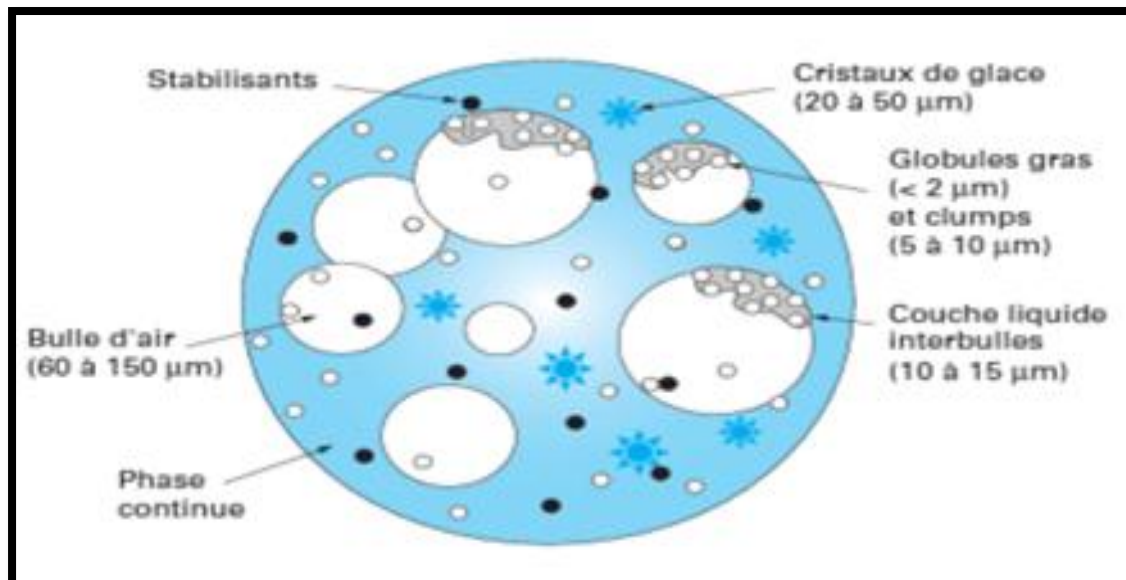


Figure 4 : Structure schématique d'une crème glacée (Boutonnier. 2001).

1.2 Rôles des constituants

Les différents ingrédients utilisés dans une crème glacée jouent un rôle spécifique suivant leur nature et leur teneur. Ainsi :

✓ Les matières grasses et les produits sucrants varient en proportion suivant la qualité désirée et la matière sèche totale préconisée, dont dépendent le point de congélation, la durée de vie et d'autres attributs sensoriels : saveur sucrée, texture... La teneur en matière grasse influence la rétention d'arômes (Blond. 2000).

- ✓ La teneur en sucre et la déterminante de la texture, mais elle a un fort pouvoir viscosant (Berger et al. 1972).
- ✓ Les stabilisants ont pour rôle d'empêcher la formation de gros cristaux de glace et sont ajoutés à des doses très faibles pour modifier la teneur en matière sèche ou la valeur nutritionnelle.
- ✓ Les émulsifiants sont incorporés dans le mix pour stabiliser les émulsions, donner une structure moelleuse et réduire le temps de battage de la crème. Ils permettent une incorporation de fines bulles d'air dans la masse (Boutonnier. 2001).
- ✓ Les Œufs et les ovo-produits utilisés dans certaines crèmes glacées: soit le jaune d'œuf qui outre que son pouvoir colorant contient de la lécithine qui est un agent émulsionnant, ou le blanc d'œuf qui est un excellent agent moussant qui facilite le foisonnement du mix (Boutonnier. 2001).
- ✓ Les gélifiants figurent parfois dans les préparations industrielles mais sont plus utilisées dans celles artisanales. Elles proviennent des fruits comme la pectine de pomme, par exemple. Ces molécules lient l'eau libre en un réseau stable ce qui améliore la texture de la glace.
- ✓ Les Fruits et dérivés: permettent soit de créer marbrures colorées internes, soit de fourrer l'intérieur, offrant ainsi une variété de saveur, qui peut être renforcé par l'ajout des arômes (Boutonnier. 2001).

1.3 Caractéristiques

La phase continue de la crème glacée est composée de solutés solubles dans l'eau tels que les sucres, les protéines et les agents stabilisants ainsi que de la matière grasse émulsifiée. Suivant le type de produit, la composition peut varier en ce qui concerne la teneur en matière grasse, les solides du lait non gras (SLNG) et les produits sucrants. Le tableau 1 présente le pourcentage massique des ingrédients composant la crème glacée.

Tableau 1 : Composition des mix de la crème glacée (Marshall et Abruckle. 1996)

Ingrédients	% massique Crème Glacée
Eau	55 – 64
M.G du lait	10 – 16
SLNG	9 – 12
Sucre	10 – 14
M.S. Sirop de glucose	4 – 5
Hydrocolloïdes	0,2 – 0,4

La CG étant dérivée des produits laitiers, possède les caractéristiques nutritionnelles de ces derniers, ainsi une part de CG apporte près de 150 mg de calcium, soit autant que 10 cl de lait.

Cet apport n'est pas négligeable, puisqu'il permet de couvrir 10 à 12% des besoins quotidiens en Calcium d'un adolescent (Périault. 2010).

Le tableau 2 présente l'apport énergétique (Calories), les nutriments (protéines, glucides, lipides, sodium, sels minéraux et vitamines) contenus dans une portion de 100 g et qui entrent dans la composition de la crème glacée.

Tableau 2 : Valeur alimentaire dans une portion de 100 g de crème glacée (Ciquel 2013)

Energie	Crème glacée
Composition	184 Kcal
Protéines	3,58 g
Glucides	19,7 g
Lipides	10,1 g
Eau	65,5 g
Calcium	104 mg
Vitamine C	0,8 mg

2. Marché des glaces au Maroc

Le marché de la glace est alimenté par deux groupes de producteurs, ceux du secteur industriel et ceux du secteur artisanal constitué essentiellement des cafés, des glaciers... et des fabriques de quartiers. Ces derniers se développent très rapidement en raison du manque de contrôle. Cette production est aussi importante que la production industrielle en volume, mais il n'y a pas de chiffres officiels, les deux groupes se partagent le marché (Jdily. 2008).

La concurrence entre les deux secteurs a poussé les professionnels à réagir et assurer une gamme de produits dont les prix commencent de 1,50 DH, pour que cette denrée soit accessible à tout le monde, surtout les enfants qui sont le public privilégié. Par contre, dans les grandes et moyennes surfaces, les cafés, hôtels, restaurants, on trouve des gammes spécifiques dont les prix varient entre 35 et 55 DH. Le prix des glaces «au bon goût» demeure hors de la portée de certaines bourses (Aboufikr. 2013).

3. Fabrication industrielle

Les différents ingrédients utilisés dans une crème glacée sont tout d'abord mélangés, ensuite vient la pasteurisation qui est faite soit à 65°C pendant quelques minutes, soit à 85°C pendant quelques secondes. Elle est suivie d'une homogénéisation du mix à chaud (>60°C) sous haute pression (15 – 25 MPa) puis dans un 2^{ème} stade à pression réduite (3 à 4 MPa) ce qui assure la dispersion des globules gras et leur stabilisation dans l'émulsion. Après vient le refroidissement qui a lieu à +4°C qui continue avec une agitation modérée à cette température on a la maturation qui

visée à optimiser la texture de la crème glacée en donnant le temps aux différentes molécules (Hydrocolloïdes, caséines, MG) de se réarranger et d'évoluer vers des structures plus stables (Mathlouhi et Rogè, Les crèmes glacées).

Enfin a lieu l'étape de congélation (-4 à -8°C) pendant laquelle les cristaux de glace se forment dans l'émulsion, et a lieu le foisonnement qui consiste à une incorporation de l'air dans la masse. Plus il y'a de l'air, plus la crème sera légère et onctueuse, et moins il y'en aura plus elle sera lourde avec une texture dure. La quantité de l'air est d'environ 80% du volume de la glace. C'est pourquoi les glaces sont vendues au volume plutôt qu'au poids (Bond .2000).

Lorsque le mélange est suffisamment froid et homogène, il est conditionné dans des bacs puis congelé à -40°C pour qu'il durcisse. Les bacs sont emballés puis distribués dans des points de vente, où ils sont stockés à -18°C au minimum (Rapin. 2013). Une bonne partie de la qualité de ce produit qu'elle soit physico-chimique ou bactériologique est régulée lors de cette étape. Un respect sans faille peut garantir de longues durées de vie des produits.

4. Fabrication artisanale

La première étape consiste à mélanger les ingrédients, qui sont généralement le lait, la crème et le sucre additionnés de fruits, d'arômes, de gélifiants...

Après le mélange des ingrédients, la masse est pasteurisée, et va ensuite reposer au frais durant plusieurs heures. Ce repos sert de maturation au mix, puis ce dernier est versé dans une sorbetière. Celle-ci se compose d'un cylindre contenant trois pales. La paroi du cylindre est froide afin de refroidir le mix lors de son contact, les pales tournent sans arrêt pour malaxer le mélange et ainsi obtenir une masse glacée homogène. Le malaxage lors de la congélation est essentiel afin d'éviter la formation de cristaux de glace trop gros (Rapin. 2013).

5. Rapport coût/qualité hygiénique

Le choix des matières premières est très important pour sublimer le goût et la qualité hygiénique du produit fini qui dépendent de celle du produit initial et font que les prix varient. Cette variation est dû aux :

- Hausse du cours des matières premières, en particulier le lait dont le coût sur le marché international a affiché une augmentation de 40 à 50% en deux ans (de 2006 à 2008).
- Conditions de fabrication et de vente très strictes. La crème glacée doit être travaillée dans les conditions d'hygiène les plus vigilantes et implique l'utilisation des matières premières de bonne

qualité hygiénique, des équipements spécialisés, l'entretien des unités de production de conditionnement et de transport, sans oublier le personnel qui devrait être habilité et qualifié.

II. Critères de qualité microbiologique des crèmes glacées

Au Maroc, pour être reconnues propres à la consommation, les denrées Animales ou d'Origine Animale doivent répondre aux normes microbiologiques fixées selon l'arrêté conjoint du Ministre de l'Agriculture et du Développement Rural, du Ministre de la Santé et du Ministre de l'Industrie, du Commerce et des Télécommunications n°624-04 (Bulletin Officiel n°5214. 2004)

Cet arrêté a pour objectif de vérifier le respect des règles et des critères prévus dans le plan de la maîtrise sanitaire dont la bonne application du règlement des critères microbiologiques. Il permet aux professionnels de diriger leurs recherches vers telles ou telles analyses. En fonction des bactéries recherchées, ils comparent leurs résultats aux critères réglementaires fixés pour en apporter une interprétation, ainsi que pour les services d'état aux activités relatives à l'inspection sanitaire et qualitative des denrées animales et d'origine animale garantissant ainsi la sécurité du consommateur (Kadiri Yamani. 2015).

1. Définition

Critères microbiologiques : ensembles des paramètres indissociables à respecter pour la mise en œuvre des prélèvements et des analyses microbiologiques, et pour l'interprétation des résultats : catégorie de la denrée alimentaire prélevée, micro-organisme concerné, et paramètres d'interprétation (Arrêté n° 2011-2567\GNC).

Qualité : appréciation portée sur la qualité hygiénique d'un lot de denrée alimentaires au regard des critères prévus par l'arrêté (Arrêté n° 2011-2567\GNC).

Le présent tableau représente les analyses microbiologiques auxquels doivent être soumis les produits glacés à base de lait, afin de déterminer leur qualité :

Tableau 3 : La microflore recherchée dans une crème glacée selon l'arrêté n°624-04

Désignation		FMAT 30°C (g)	Coliformes 30°C (g)	Coliformes fécaux 44°C (g)	<i>Staphylococcus Aureus</i> (g)	Anaérobies sulfito- réducteurs 46°C (g)	<i>Salmonella</i> dans (25g)	<i>Listeria mono- cytogenes</i> dans (1g)
Produits glacés à base de lait	m	10 ⁵	10	—	10	—	Absence	Absence 1g
	M	5.10 ⁵ n=5, c=2	10 ² n=5, c=2	—	10 ² n=5, c=2	—	Absence n=5, c=0	Absence 1g

Sachant que :

m = est le critère fixé par l'arrêté, selon lequel tous les résultats égaux ou inférieurs sont considérés satisfaisants.

M = Seuil limite d'acceptabilité, au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisant, sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique

n = Nombre d'unités composant l'échantillon

c = Nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs situés entre m et M

Selon ces données on peut déterminer deux principes pour l'interprétation des résultats

Plan à trois classes : Où les résultats des examens interprétés sur cette base permettent de fixer trois classes de contamination (Bulletin Officiel n°5214. 2004) :

- Celle inférieure ou égale au critère m , sont dits de qualité **satisfaisante**.
- Celle comprise entre le critère m et le seuil M , sont dits de qualité **acceptable**.
- Celle supérieure au seuil M , sont considérés comme **non satisfaisant**.

Plan à deux classes : Ce plan qui n'accepte aucune tolérance, même de caractère analytique, permet de déterminer deux types de contamination en utilisant deux expression (Bulletin Officiel n°5214. 2004) :

- « Absence dans » : le résultat est considéré comme **satisfaisant**.
- « Présence dans » : le résultat est considéré comme **non satisfaisant**, et le produit alors est déclaré **non propre à la consommation**.

Et d'après le tableau, ce plan est applicable pour *Salmonella* et *L. Monocytogenes*.

La présence ou l'absence de chacun de ces germes permet d'interpréter les résultats obtenus par les analyses effectuées et savoir la non-conformité des crèmes glacées est due à quel paramètres, où :

2. Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT)

La FLAT concerne surtout les germes revivifiables que ce soit des bactéries, des levures ou des moisissures, car il est impossible de dénombrer la flore totale réelle, sa présence est tolérable s'elle ne dépasse pas le seuil d'acceptabilité, son dénombrement constitue :

- Un indicateur de la qualité sanitaire et reflète l'HISTOIRE, l'état de fraîcheur ou de décomposition
- Un indicateur spécifique d'aspect défectueux de la qualité des opérations de production, des traitements technologiques, de transport, d'entreposage etc. (Louis. 2007).

3. Coliformes Totaux (CT)

Les CT regroupent plusieurs espèces bactériennes de la famille des *Entérobactériaceae* bacilles gram⁻, dont le dénombrement sert à évaluer la qualité hygiénique (Louis. 2007). et met en évidence :

- Contamination d'origine fécale (manipulation avec des mains mal ou non lavées).
- Utilisation de denrées crues mal nettoyées (fruits), ou de torchons à usage multiple.
- Traitement thermique insuffisant (inférieur à 65°C), ou conservation inadéquate ou trop longue.

4. Flore pathogène

Le terme pathogène (du grec naissance de la douleur) signifie : qui entraîne une maladie.

4.1 *Staphylococcus aureus*

Ce germe naturellement présent sur la peau et les muqueuses nasales de l'homme et des animaux, la bouche et la gorge avec des charges qui peuvent largement dépasser les 100000 germes/cm² (Louis. 2007). Seuls les *S. aureus* coagulase positive capables de produire une entérotoxine qui cause les intoxications alimentaires (Poutrel. 1992) peuvent contaminés les aliments par :

- Les mains d'un cuisinier à plaies abcès, contamination humaine cutané.
- Étant thermosensibles elles sont généralement détruites au cours de la pasteurisation, d'où le risque rencontré dans les crèmes glacées artisanales dont le lait peut être non traité thermiquement. (Louis, 2007).

4.2 *Salmonella spp.*

La contamination des aliments en général par ce *Salmonella* est de plus en plus prépondérante ce qui constitue un sérieux problème, que ce soit pour les viandes qui sont les vecteurs les plus communs ou pour les autres variétés de produits (Corpet. 2014) Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et colonisant les intestins des animaux et l'homme, présentes dans les selles de malades ou de porteurs sains, témoigne de :

- Contamination fécale par les mains mal-lavées.
- Lors de l'éviscération de viandes (volaille en particulier)
- Contamination croisée dans les cuisines sur les aliments servies sans cuisson
- Souillures divers (insectes, rongeurs), manque général d'hygiène et de propreté.

4.3 *Listeria monocytogenes*

Ce germe ubiquiste opportuniste psychotrope, est le seul pathogène des 7 espèces de *Listeria*, provoque des épidémies majeures et des incidences, car elle peut franchir: les barrières intestinales, hématoencéphalique et foetoplacentaire . *Listeria monocytogenes* résiste bien aux stress physique (froid, chaud, sel, acide). Sa présence dans les aliments qui peuvent tous être contaminés (Corpet. 2014), peut venir de :

- De l'animal producteur (par le lait, si mauvaise ensilage).
- Atelier de fabrication (par surfaces humides et personnel).
- Enrichissement lors du stockage au froid. Profite de la moindre rupture de la chaîne de froid.
- Environnement, personnel, et chambre de froid.
- Chez le consommateur par les torchons, frigidaires où les 2/3 des frigos sont contaminés (Corpet. 2014)

5. Action des MO dans les aliments

Le développement des MO dans un aliment (Cappelier. 2009) peut avoir deux actions néfastes :

- Affecter la qualité intrinsèque de l'aliment et donc sa valeur commerciale (modification de texture et d'aspect, altération de la valeur alimentaire, altération des qualités organoleptiques etc....).
- Dangereux pour la santé et étant responsables d'intoxications dues à la formation de substances toxiques (amines), ou même d'infections ou toxi-infection bénignes.

III. Incidence sanitaire liée à la consommation des crèmes glacées contaminées

Les membres de l'FAO et de l'OMS ont exprimé leur inquiétude au sujet de la sécurité sanitaire des aliments au niveau tant national qu'international (Buchanan et al. 2004).

Au Maroc le marché des crèmes glacées étant partagé entre deux secteurs différents et compte tenu du risque zéro qui n'existe pas, mais qui s'élève dans les crèmes glacées fraîches dites à l'ancienne fabriquées et vendues à proximité des rues et près des écoles, et qui n'ont pas pour soucis de stabiliser leur bactériologie car leur coût est à quelques menues monnaies. Nécessitent des plans de contrôle vigilants afin de prévenir et lutter contre les toxi-infections liés à leur consommation.

1. Maladies d'Origine Alimentaire

Une maladie d'origine alimentaire, est définie selon l'OMS comme étant : Une affection, en général de nature infectieuse ou toxique, provoquée par des agents qui pénètrent dans l'organisme par des biais des aliments ingérés. Cette définition internationale, permet de les classer en :

1.1 Maladies d'origine infectieuses

Une TIA est une maladie, souvent infectieuse et accidentelle, contractée suite à l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminées par des agents pathogènes qu'il s'agisse de bactéries, de virus, de parasites. (Département de sécurité sanitaire des aliments, zoonoses et maladies d'origine alimentaire OMS. Sécurité sanitaire des aliments). Cette dernière à deux formes :

- ✓ Forme sporadique : cas non liés entre eux
- ✓ Forme collective : TIAC qui est une maladie infectieuse à Déclaration obligatoire qui a lieu lorsqu'il existe au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut apporter la cause selon (Boyrlieux. 2000) à une même origine alimentaire

1.2 Intoxications alimentaire

Selon l'OMS une intoxication est une lésion cellulaire ou tissulaire, un trouble fonctionnel ou un décès causés par l'inhalation, l'ingestion, l'injection ou l'absorption d'une substance toxique ou « poison » (Bourlioux. 2000).

2. Intoxications Alimentaires liés aux crèmes glacées au Maroc

Le Maroc est l'un des pays concernés par le problème des IA, où 18 000 cas déclarés en 20 ans (Mdidech. 2011). De 1980 à 2007 le CAPM a collecté 78 374 cas d'intoxications (Ouammi et al. 2009), survenues dans les seize régions du Royaume, dont la létalité était de 15.34%.

En 2009 les dernières statistiques du CAPM ont déclaré 292 cas des TIAC, parmi les produits incriminés, les produits laitiers et leur dérivés occupés une partie importante.

Partie II : Matériel et méthodes

I. Échantillons analysés

Pendant la période de l'étude, réalisée dans le cadre du contrôle hygiénique des CG au sein du LRARF. Nous avons effectué l'analyse microbiologique de 35 d'échantillons de crèmes glacées, dont 27 étaient à une seule unité/échantillon, tandis que 8 se sont présentés en 5 unités/échantillon. Ces échantillons provenaient des zones d'activités du laboratoire qui s'étend en plus de la Wilaya de Fès et Meknès, aux provinces de Taounate, Ifrane, Khémisset, Boulmane, Er-Rachidia ainsi que la zone économique centre nord.

Ces échantillons, sont prélevés par un service sous la tutelle de l'ONSSA et dont le laboratoire n'est pas responsable. Le laboratoire ne révèle pas le lieu de prélèvement exact pour des raisons de confidentialité.

II. Analyses microbiologiques d'évaluation de la qualité des crèmes glacées

Ces méthodes d'analyses ont été réalisées selon l'arrêté conjoint n°624-04, et normalisées par des normes de qualité des produits alimentaires.

Ces analyses consistent en une recherche et/ou une numération des germes microbiens rencontrés dans la crème glacée, afin de maîtriser leur présence et ou absence (dans le cas des germes pathogènes responsables des maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas des germes peu dangereux et contaminants normaux des matières premières composants la denrée).

1. Préparation des échantillons pour essai

Après réception des échantillons, ceux-ci sont stockés en attendant l'analyse microbiologique à -18°C, dans un congélateur consacré pour les produits avant analyse.

Après décongélation, les crèmes glacées sont homogénéisées par une agitation énergique dans le bocal de prélèvement.

2. Prise d'essai, suspension mère et dilution

Quelque soit la nature initiale du produit l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension.

Après ouverture aseptique, en milieu aseptisé, sous une hotte à flux laminaire, nous avons pesé sur une balance tarée 25 g de crème glacée à analyser (pour *Salmonella*, *S. aureus*, CT, FMAT) et 1g (pour *L. monocytogenes*) dans un sac stomacher stérile, que nous avons mélangé avec un volume neuf fois égal de diluant soit 225 ml de l'EPT (Annexe 2) qui est un bouillon de revivification pour le dénombrement nous avons obtenu ainsi la dilution 10^{-1} . Le sac est ensuite scellé et placé dans l'appareil stomacher pour le broyage qui permet d'obtenir une répartition aussi uniforme que possible des MO contenus dans la prise d'essai.

En vue de réduire le nombre de MO par unité de volume, permettant ainsi après incubation d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), nous avons réalisé une série de dilutions décimales à partir de la solution mère, en mélangeant un volume mesuré de cette solution avec un volume neuf fois égal de diluant, qui est le T-sel. Nous avons répété cette opération sur les dilutions suivantes, et chaque dilution est agitée et effectuée avec une pipette graduée stérile distincte. Jusqu'à obtention d'une gamme de dilution décimale appropriée pour l'inoculation des milieux de culture (Boukrouh. 2005).

3. Dénombrement de FMAT

Après avoir préparé la gamme de dilution, sous la hotte on ensemence avec une pipette stérile 1 ml ou 0,1 ml de chaque dilution et on dépose à la surface des boîtes de pétri, qu'on recouvre avec environ 15ml la gélose PCA au lait (Annexe 2) qui convient mieux aux germes exigeant tel que les bactéries lactiques. On homogénéise soigneusement et on laisse solidifier le mélange inoculum-milieu, et on coule encore en surface la gélose blanche (neutre) pour éviter des colonies envahissantes, et on incube les boîtes d'une manière inversée à 30°C pendant 72h ±3h

4. Dénombrement des CT

La numération des bactéries gram⁻ indicatrices d'hygiène, les coliformes totaux est réalisée par ensemencement en profondeur de 1ml de la suspension mère ou de ses dilutions avec une pipette stérile et déposé dans une boîte de pétri sur laquelle on coule 15 ml de la gélose VRBL (Annexe 2) préconisé par l'AFNOR. C'est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement de ce groupe, après homogénéisation et solidification 4 ml de milieu sont ajoutés en surface et après nouvelle solidification, la boîte ensemencée est incubée à 30°C pendant 24h±2h.

Les coliformes donnent des colonies rouges dont le diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm (Figure 7).

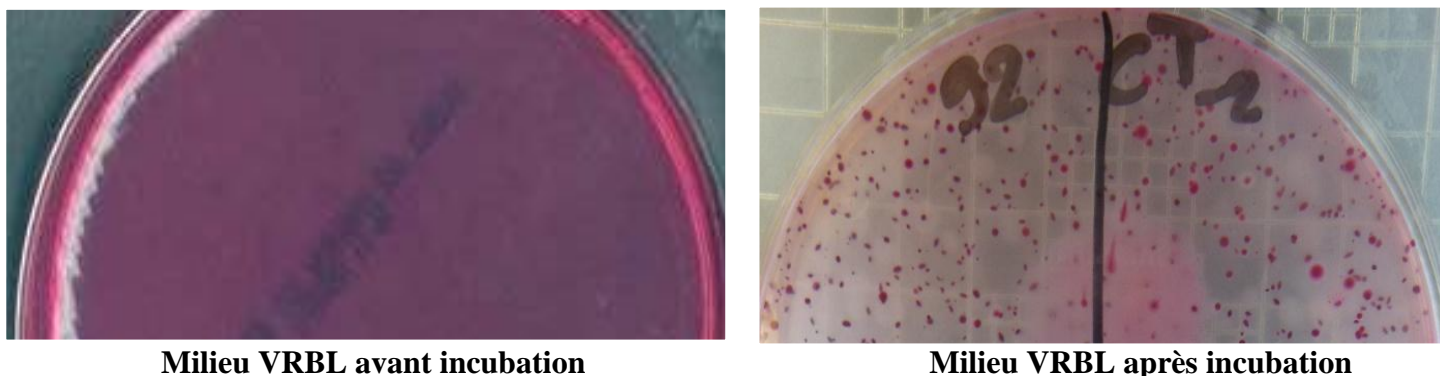


Figure 5 : Aspect la gélose VRBL avant et après incubation

5. Dénombrement de *S. aureus*

A partir de la suspension d'essai ou de ses dilutions, on introduit une pipette stérile et on prend 1ml qu'on ensemence dans une boîte de Petri. On coule après la gélose BP avec RPF (Annexe 2). Ce milieu permet la détection et la numérotation directe des Staphylocoques pathogènes, sans avoir besoin de les confirmer. Après solidification on incube les boîtes 24h à 37°C.

Les colonies noires, brillantes, entourées d'un halo opaque présomptives, sont considérées caractéristiques de *S. Aureus*.

6. Recherche de *Salmonella*

La recherche de *Salmonella* nécessite cinq étapes successives :

6.1 Pré-enrichissement en milieux non sélectif liquide

Cette étape correspond à l'étape de la préparation de la solution mère, où on a ensemencé 25g de la prise d'essai dans 225 ml de l'EPT qui est utilisé à la fois comme diluant et comme milieu de pré-enrichissement non sélectif. Elle est conforme aux « NF EN ISO 6579, NF V 08-052 ». On homogénéise au stomacher pendant 60 secondes, puis on incube à 37°C pendant 18h± 2h.

6.2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides

Après incubation on ensemence à partir du milieu de pré-enrichissement un volume variable dans les bouillons RVS et MKTTn (Annexe 2). Le tableau 4 présente les volumes à repiquer ainsi que les T°C d'incubation, correspondant à chaque milieu.

Tableau 4 : Volumes et Températures d'incubation pour chaque milieu

Bouillon Sélectif	Volume à ensemencés	T°C d'incubation
Bouillon Muller et Kauffman	1 ml	24h/ 37°C
Bouillon Rappaport Vasiliadis	0,1 ml	24h/41,5°C

6.3 Isolement

À partir des cultures obtenues après enrichissement dans les bouillons MKTTn et RVS, on ensemence 0,1 ml par des stries sur deux milieux sélectifs solides permettant l'isolement. On incube les boîtes à 37°C pendant 24 h. Les milieux sélectifs utilisés sont :

➤ **La gélose Xylose – Lysine – Désoxycholate (XLD) :** La gélose XLD est utilisé pour l'isolement des entérobactéries pathogènes, dans les produits alimentaires suivant la norme « NF EN ISO 6579 », elle permet la mise en évidence de *Shigella*, *Providencia*, *Edwardsiella*, qui fermentent le xylose lentement ou pas du tout, contrairement aux *Salmonelles* qui en plus de leur aptitude à fermenter le xylose se différencient par leur capacité à décarboxyler la lysine. Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore contaminante à Gram+. On considère *Salmonelle* toute colonie rouge au centre noir, mais nous procédons par la suite à une confirmation (Fiche du laboratoire).

➤ **La gélose Brillant-Green-Agar (BGA)** La Gélose BGA est, très sélectif, utilisé pour l'isolement de *Salmonella*, selon la norme « ISO 6579 ». Elle présente la particularité *Salmonelles* d'inhiber la flore Gram+ et de la plupart des Gram- grâce au vert brillant. Sont considérées toute colonie rose (Fiche du laboratoire).

6.4 Identification

Sur la gélose TSI incliné dans des tubes, qui permet l'identification des entérobactéries par la mise en évidence rapide de : la fermentation du lactose, du glucose, du saccharose, la production de sulfure d'hydrogène et la production ou non du gaz.

Nous ensemençons à partir du centre d'une colonie pure suspecte du milieu d'isolement sélectif : le culot par une piqûre centrale et la surface inclinée par des stries serrées. On laisse les capsules desserrées pour favoriser les échanges gazeux, puis on incube à 37°C pendant 24h .

Fermentation du Glucose :

- Culot rouge : Glu non fermenté.
- Culot jaune : Glu fermenté.

Fermentation du lactose :

- Pente rouge : Lac non fermenté.
- Pente jaune : Lac fermenté.

Formation d'H₂S :

- Apparition de précipité noir.
- #### Production de gaz :
- Gélose décalée.

Nous utilisons la galerie API 20E pour la confirmation biochimique. Cette galerie comporte 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés prêts à l'emploi permettant de réaliser 23 tests qui permettront d'identifier la *Salmonella* en question. Les étapes sont présentés dans la figure 6.

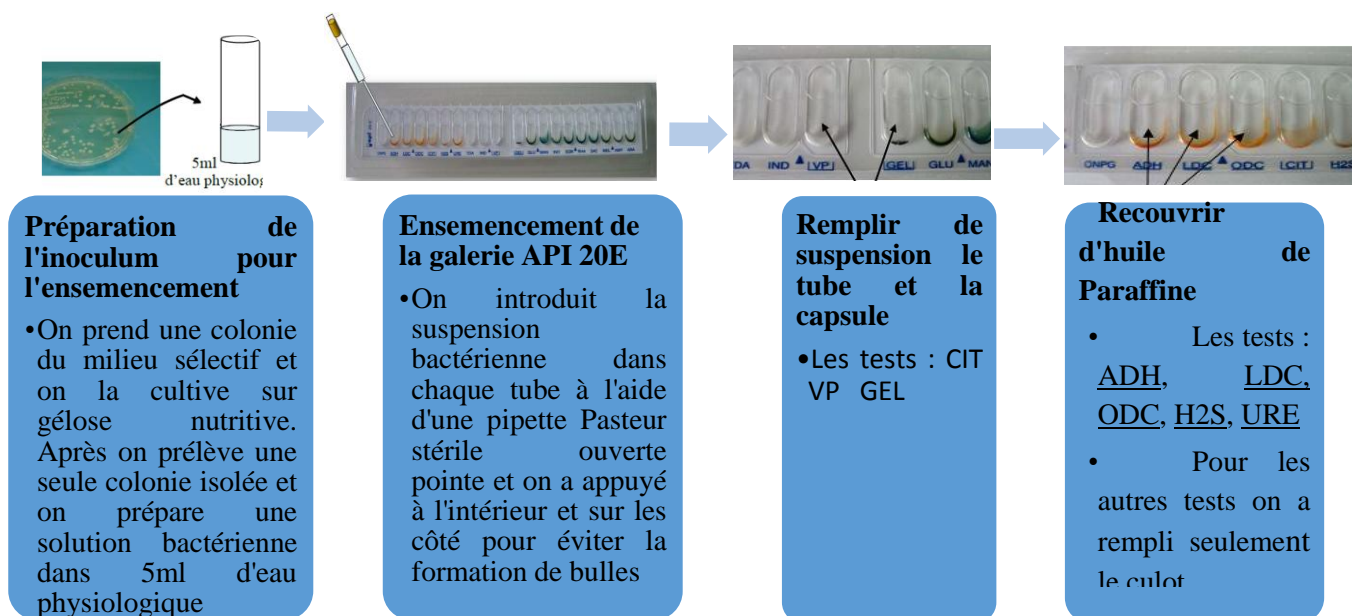


Figure 6 : Étapes de préparation d'une galerie API 20E pour identification de *Salmonella*

Après avoir réuni fond et couvercle de la boîte, on l'a incubée à 37°C pendant 18h à 24h.

6.5 Test sérologiques

On repique les colonies depuis la gélose TSI, sur une lame où se trouve une goutte d'immuns sérums spécifiques. Après un temps on observe si il y'a d'agglutination.

Si oui on déduit que le germe en question est une *Salmonella*.

7. Recherche de *L. monocytogenes*

La recherche de *L. monocytogenes* se fait dans 1 g d'échantillon, comme suite :

7.1 Enrichissement primaire en milieu non sélectif liquide

On prend avec une pipette stérile 1g de l'échantillon à analyser soit 1ml, on le mélange avec un volume neuf fois égal de bouillon de ½ Fraser puis on incube à 30°C, pendant 24h.

7.2 Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide

À partir de la solution du pré-enrichissement on ensemence 0,1 ml avec une pipette stérile, dans 0,9 ml du bouillon Fraser et on incube à 30°C de 24h à 48h.

Le noircissement du tube indique de façon présomptive la présence de *L. monocytogenes* (réduction de l'esculine) que ce soit sur le bouillon Fraser ou Fraser-demi.

7.3 Isolement primaire

À partir des cultures obtenues après enrichissement, on effectue un ensemencement par épuisement sur deux milieux solides sélectif Palcam et ALOA, et on incube à 37°C pendant 48h. Il s'agit de l'isolement primaire (IP).

7.4 Isolement secondaire

Après la première lecture on procède à un second isolement (IS) sur les mêmes milieux de culture Palcam et ALOA, et après 48h d'incubation à 37°C on observe des colonies caractéristiques.

- Sur Palcam : des colonies gris-vertes à noir avec halo noir. (Figure 10)
- Sur ALOA : des colonies vert-bleu avec un halo opaque (Figure 10)



Figure 7 : Aspect des colonies de *L. monocytogenes* sur le milieu ALOA et Palcam

7.5 Confirmation :

La confirmation biochimique s'effectue à l'aide d'une galerie API *Listeria*. La lecture est obtenue grâce au tableau de catalogue Analytique.

Le tableau 5 est un récapitulatif des méthodes d'analyses microbiologique effectuées :

Tableau 5 : Résumé de méthodes d'ensemencement, milieux de culture et T°C d'incubation pour : FMAT, CT et *S. aureus*

Flore recherchée	FMAT	CT	<i>S. aureus</i>
Référence Normative	NF EN 4833-1	NM ISO 4832	NM ISO 6888-2
Milieux de culture	PCA	VRBL	BP + RPF
Technique d'ensemencement	En Profondeur	En profondeur	En profondeur
T°C d'incubation	30°C ± 1°C	30°C ± 1°C	37°C ± 1°C
Durée d'incubation	72h ± 3h	24h ± 2h	18h à 24h ou plus
Colonies Caractéristiques	Toute colonie	Rougeâtre > 0,5 mm	Colonie à centre noir entouré d'un halo opaque
Boîte comptable	Si < 300 colonie	10 < n < 150	15 < n < 300, dont 100 sont caractéristiques

Tableau 6 : Résumé de méthodes d'ensemencement, milieux de culture et T°C d'incubation pour : *Salmonella* et *L. monocytogenes*

Flore recherchée	Référence Normative	Milieux de culture	Technique d'ensemencement	T°C d'incubation ($\pm 1^\circ\text{C}$)	Durée d'incubation	Colonie caractéristique
<i>Salmonella</i>	NM ISO 6579	EPT		37°C	18h \pm 2h	Trouble du bouillon
		MKTTn		37°C	24h \pm 3h	
		RVS		41,5°C		
		XLD	En surface	37°C	24h \pm 3h	Colonie à centre noir
		BGA				Rosées entourées de zone rouge
		TSI	En surface	37°C	24h \pm 3h	
<i>L. monocytogenes</i>	NM ISO 11290-1	1/2 Fraser		30°C	24h \pm 2h	Noircissement du tube
		Fraser				
		Palcam	En surface	37°C	24h à 48h	Gris vertes à noir avec halo noir
		ALOA				Vert bleu avec halo opaque

Expression des résultats

Le comptage des boîtes est généré par l'amendement 2013 à ISO 7218. Dont la détermination des boîtes comptables dépend du germe.

Pour exprimer les résultats en **UFC/g** (Unité Formant Colonie), on utilise la formule

mathématique suivante :

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{1,1 \times d_1}$$

Avec : ■■ **N** : nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial .

■■ **$\sum \text{colonies}$** : sommes des colonies de deux boîtes de dilutions successive interprétables .

■■ **d_1** : facteur de la première dilution retenue .

Partie III : Résultats et Déclaration de Conformité

I. Lecture de résultats

Le tableau 6 présente les résultats des analyses de 27 échantillons de crèmes, prélevés pendant la période de stage au sein de l'unité microbiologie alimentaire du LRARF. Les analyses concernent une seule unité/échantillon.

Tableau 7 : Résultats du dénombrement de la FMAT, des CT, des *S. aureus*, et la recherche de *Salmonella* et *L. monocytogenes* dans les échantillons de crèmes glacées

	FMAT		CT		<i>S. aureus</i>		<i>Salmonella</i>		<i>L. monocytogenes</i>	
	m	M	m	M	m	M	m	M	m	M
	10 ⁵	5.10 ⁵ n=5, c=2	10	10 ² n=5, c=2	10	10 ² n=5, c=2	—	— n=5, c=0	— 1g	— 1g
Ech1	N ^o =2,1.10 ⁷		N ^o =1,8.10 ⁵		< 10		—		—	
Ech2	N ^o =5,5.10 ⁶		N ^o =3.10 ⁵		< 10		—		—	
Ech3	N ^o =8,5.10 ⁵		N ^o =1,6.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech4	1,1.10 ⁵		4,5.10 ²		< 10		—		—	
Ech5	2,5.10 ⁴		1,4.10 ²		< 10		—		—	
Ech6	N ^o =5.10 ⁴		N ^o =2,8.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech7	N ^o =6.10 ⁶		< 10		< 10		—		—	
Ech8	N ^o =5,6.10 ⁶		N ^o =4,7.10 ³		< 10		—		—	
Ech9	2,2.10 ⁵		1,4.10 ³		< 10		—		—	
Ech10	N ^o =2,1.10 ⁶		N ^o =5,7.10 ³		< 10		—		—	
Ech11	1,2.10 ⁵		3,3.10 ²		< 10		—		—	
Ech12	2.10 ⁵		6,6.10 ²		< 10		—		—	
Ech13	10 ⁵		N _E =50		< 10		—		—	
Ech14	10 ⁵		N ^o =2,6.10 ³		< 10		—		—	
Ech15	7,9.10 ⁴		N ^o =4,2.10 ³		< 10		—		—	
Ech16	N ^o =3,2.10 ⁶		N ^o =3.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech17	2,3.10 ⁵		1,1.10 ³		< 10		—		—	
Ech18	N ^o =2,4.10 ⁶		N ^o =3.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech19	1,1.10 ⁵		2,1.10 ²		< 10		—		—	
Ech20	10 ³		9,6.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech21	10 ³		1,3.10 ³		< 10		—		—	
Ech22	N ^o =5.10 ⁵		7,9.10 ²		< 10		—		—	
Ech23	N ^o =2,6.10 ⁴		N ^o =2,3.10 ⁴		< 10		—		—	
Ech24	N ^o =3,1.10 ⁴		N ^o =4,3.10 ³		< 10		—		—	
Ech25	N ^o =1,4.10 ⁴		N ^o =7,9.10 ⁵		< 10		—		—	
Ech26	1,2.10 ⁵		8,3.10 ³		< 10		—		—	
Ech27	4,8.10 ⁴		1,7.10 ³		< 10		—		—	

- ■ N' : Le résultats a été calculé à partir d'une seule boîte.
- ■ * : Critère d'acceptabilité selon l'arrêté conjoint du ministre de l'agriculture, du ministre de la santé, du ministre de l'industrie et du commerce n° 624-04.
- ■ N_E= Nombre estimé de MO / (g).
- ■ — : Absence.

D'après les résultats de cette série d'analyses et les critères fixés par l'arrêté, nous remarquons que :

- ■ Tous les échantillons sont de qualité microbiologique satisfaisante pour les *S. aureus*, *Salmonella* et *L. monocytogenes*
- ■ Les échantillon 1, 2, 3, 8, 10, 16, 18 sont de qualité non satisfaisante pour la FMAT et les CT.
- ■ Les échantillons 4, 6, 9, 11, 12, 17, 19, 22, 26 sont acceptables pour la FMAT et non satisfaisants pour les CT.
- ■ Les échantillon 5, 14, 15, 20, 21, 23, 24, 25, 27 sont satisfaisants pour la FMAT et non satisfaisants pour les CT.
- ■ L'échantillon 7 est satisfaisant pour les CT et non satisfaisant pour la FMAT.
- ■ L'échantillon 13 est satisfaisant pour la FMAT et acceptable pour les CT.

Le tableau 7 présente les résultats d'analyses de 8 échantillons de crèmes glacées survenues au laboratoire à 5 unités par chaque échantillon.

Tableau 8 : Moyenne des résultats du dénombrement de : la FMAT, des CT, des *S. aureus*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* dans des échantillons de CG (moyenne de 5 prélèvements)

Analyses effectuées	Critère d'acceptabilité		Résultats $\bar{\delta}$							
	m	M	Ech28	Ech29	Ech30	Ech31	Ech32	Ech33	Ech34	Ech35
FMAT	10⁵	5.10⁵ n=5, c=2	1.10⁴	2,2.10⁴	1,5.10⁴	5.10²	6.10⁶	6,6.10³	6.10⁶	5,6.10⁶
CT	10	10² n=5, c=2	2,8.10²	6,4.10²	3,4.10²	4.10²	< 10	2,1.10²	< 10	4,7.10³
<i>S. aureus</i>	10	10² n=5, c=2	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
<i>Salmonella</i>	—	— n=5, c=0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>L. monocytogenes</i>	— 1g	— 1g	—	—	—	—	—	—	—	—

- ■ $\bar{\delta}$: Moyenne des 5 Pr.

Selon les résultats d'analyses de ces 8 échantillons à 5 unités, et les critères fixés par l'arrêté pour chaque MO, nous constatons que :

- Tous les échantillons sont de qualité microbiologique satisfaisante pour les *S. aureus*, *Salmonella* et *L. monocytogenes*.
- L'échantillon 35 est dit non satisfaisant pour la FMAT et les CT.
- Les échantillons 28, 29, 30, 31, 33, sont dits satisfaisants pour la FMAT et non satisfaisants pour les CT.
- Les échantillons 32, 34, sont satisfaisants pour les CT mais non satisfaisants pour FMAT.

II. Déclaration de conformité

Tableau 9 : Déclaration de conformité des échantillons de crèmes glacées testés

Déclaration N° d'Ech	Conforme	Non Conforme	Déclaration N° d'Ech	Conforme	Non Conforme
1		✓	18		✓
2		✓	19		✓
3		✓	20		✓
4		✓	21		✓
5		✓	22		✓
6		✓	23		✓
7		✓	24		✓
8		✓	25		✓
9		✓	26		✓
10		✓	27		✓
11		✓	28		✓
12		✓	29		✓
13	✓		30		✓
14		✓	31		✓
15		✓	32		✓
16		✓	33		✓
17		✓	34		✓
			35		✓

D'après le tableau 8, on constate que les 35 échantillons de crèmes glacées analysés sont selon l'arrêté n°624-04 :

Tous Non Conforme, à l'exception de l'échantillon 13, mais nous ne pouvons pas vraiment conclure quant à la conformité de cet échantillon étant donné qu'il d'une seule unité (n=1).

III. Conformité et pourcentage des germes responsables de la non-conformité

Comme nous avons vu sur les tableaux 6,7 et 8 renseignant sur la qualité microbiologique des crèmes glacées étudiées, nous avons constaté que sur les 35 échantillons analysés seul un a été conforme soit un pourcentage de 1% face à 99% non conforme, d'après les tableaux de résultats cette non-conformité est dû à la présence de deux groupes de contaminations : la FMAT et les CT avec un pourcentage de 23%, et la dominance de la FMAT dans 9% d'échantillons, tandis que la grande partie de la NC et dû à la dominance des CT avec 66%. (Figure 12)

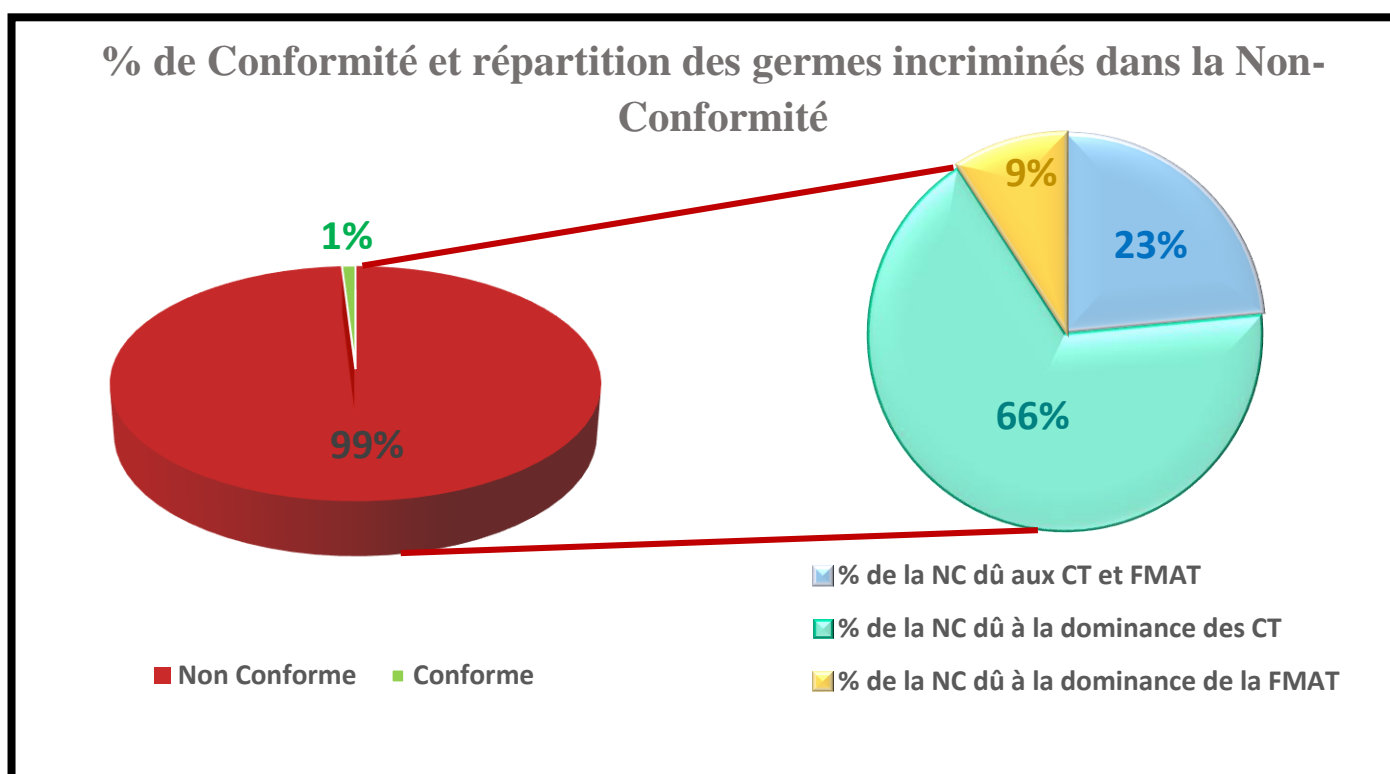


Figure 8 : Pourcentage de Conformité et NC et répartition des germes incriminés dans cette dernière

IV. Causes probables de la non-conformité

La non-conformité que nous avons enregistré dans les 34 échantillons de crèmes glacées que nous avons analysés pendant la période de l'étude réalisée au sein du LRARF, venait des niveaux élevés des CT et FMAT dans ces produits glacés. Étant donné le caractère confidentiel des analyses effectuées au sein de LRARF, quant à l'origine des échantillons, nous pouvons émettre les hypothèses suivantes pour expliquer la Non-conformité des pots glacés :

- Non-respect des bonnes pratiques de production, où : soit le personnel ne respecte pas les règles d'hygiène lors de la manipulation, soit les équipements utilisés ne répondent pas aux bonnes règles de nettoyage (contamination par les CT).
- Non-respect de T°C de conservation ou encore une conservation prolongée.
- L'insuffisance du traitement thermique lors de la préparation du mix.
- Utilisation des denrées non lavées exemple des fruits.
- Rupture de la chaîne de froid (élévation de la charge de la FMAT).

V. Discussion

L'exigence du consommateur vis-à-vis de la qualité hygiénique des denrées qu'il consomme, impose une surveillance de ces dernières de la fourche à la fourchette. Afin de garantir leur innocuité et prévenir la survenue des TIAC.

Notre étude réalisée au sein du LRARF pour le compte de son unité de Microbiologie Alimentaire, avait pour objectif l'évaluation de la qualité hygiénique des crèmes glacées survenues au laboratoire. Les échantillons étaient au nombre de 35.

Le recueil de résultats ne permet pas d'incriminer l'un des constituants comme responsable de la contamination. D'une façon générale, la non-conformité globale a été notée dans 34 échantillons, ceci correspond à un pourcentage de 99%. La non-conformité de ces échantillons de crèmes glacées est due à : 9% de la FMAT, 66% des CT, et 23% des CT et la FMAT.

La fréquence de contamination élevée de ces crèmes glacées par les bactéries indicatrices d'altération microbienne (FMAT) et contamination fécale (CT) pourrait être due à une coupure de la chaîne de froid, une conservation prolongée et/ou T°C non adaptée, d'erreur technologique telle une insuffisance du traitement thermique du mix, un non-respect vestimentaire (coiffe, gant, blouse, etc....) et/ou un non-respect des bonnes pratiques de production, de nettoyage

ainsi que de manipulation où ces crèmes glacées sont vendues en petites portions à partir de grands récipients, ainsi que la possibilité d'une contamination initiale des ingrédients.

En ce qui concerne les germes pathogènes, aucun cas de contamination que ce soit par *S. aureus*, *Salmonella* ou *L. monocytogenes* dans les 35 échantillons analysés. Contrairement à des études antérieures réalisées dans d'autres pays qui ont démontré : une contamination par les *S. aureus* de 38% en Lybie et 32% en Turquie (Ojokoh. 2006), une contamination par les Salmonelles de 5% en Lybie (Bettelheim. 2007) et 6,8% en Turquie (Yaman et al. 2006). Par ailleurs, une étude réalisée au Laboratoire Régional de Diagnostic Epidémiologique et d'Hygiène du Milieu de Fès en 2014 a montré une non-conformité de 21%, due principalement aux CT, à la FMAT et aux *S. aureus*. (Ourgha. 2014)

Conclusion

Au terme de cette étude qui a été réalisée au Laboratoire Régional d'Analyses et de Recherche de Fès, dans le but d'évaluer la qualité hygiénique des crèmes glacées, afin d'éviter les d'intoxications alimentaires dont les consommateurs peuvent être victimes. L'étude microbiologique des 35 échantillons de crèmes glacées a révélée :

- Une conformité pour *L. monocytogenes*, *Salmonella* et *S. aureus*, dans tous les échantillons
- Une diversité de charge pour les CT et la FMAT, pour lesquels nous avons noté une NC globale de 99%, avec 9%, 66% et 23%, de NC dues, respectivement,, à la FMAT, aux CT et aux CT et la FMAT ensemble.

Ceci a permis de mettre en évidence la mauvaise situation hygiénique d'une des denrées privilégiée pendant la période estivale. Une surveillance hygiénique des différentes étapes de sa préparation, sa distribution ou encore sa conservation s'impose.

Ainsi les perspectives de notre étude sont :

- Élargir d'avantage l'échantillonnage pour valider nos constatations.
- Établir des programmes visant à renforcer l'éducation sanitaire et l'hygiène alimentaire chez les professionnels mais également chez les consommateurs.
- Faire un suivi médical des personnes intoxiquées, dans l'optique d'avoir des résultats fiables concernant l'évolution de la qualité hygiénique.
- Utiliser de l'eau potable pour le nettoyage des ustensiles utilisés lors de la préparation et de la vente.
- Mettre au point un système HACCP qui pourrait améliorer la qualité hygiénique des CG.
- Respecter et contrôler la chaine de froid.

Ce stage m'a été très bénéfique car il m'a permis de mettre à profit et d'approfondir mon champs de connaissance surtout en microbiologie alimentaire et par-dessus tout d'avoir un approché du vaste monde de la recherche.

Références bibliographiques

A

- Aboufike N, La consommation des crèmes glacées explose en été. L'ECONOMISTE (2013)

B

- Bases théoriques de la structure des glaces : Influence du procédé de fabrication et de la formulation, un Colloque Alliancd 7-CEDUS « La texture des produits sucrés » P.59-60.
- Berger K.G, Bullimore B.K, White G.W & Wright W.B. The structure of ice cream – Part 1, Dairy Inustrites. P 37 (1972).
- Baumgartner T, Bischofsberger M, Dalla Torre H, Emch J.-L Gafner J, Hummerjo-hann, R, Meyer Ch, Müller P, Scheffeldt U, Spahr R, Stephan U, Wäspi, Guide pour le traitement approprié de la partie pré-analytique des analyses microbiologiques dans le domaine de la production de denrées alimentaires P 12-13 (2013).
- Bottzldoorn LNR Liste pour la microbiologie alimentaire. P 1-2-3-7 (2013).
- Bulletin Officiel n°5214 , P 16-20-21-22 (20/05/2004).
- Buchanan R, Roland L, Thomas R, Mark S, Ewen T, Richard W. Evaluation des risques liés à *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à être consommés (2004).
- Boutonnier J-L, Crèmes glacées, glaces et sorbets : formulation et fabrication P 3 (2001).
- Boukrouh N, Journal Officiel de la République Algérienne N°42 P 2-3 (2005/15/06).
- Bourlioux P. Toxi- infections alimentaires. Objectif nutrition. Janvier 49:2-8 (2000).
- Bttelheim K. The non-O157 Shiga-toxigenic (verocytotoxigenic) *Escherichia coli* ; under-rated pathogens. Crit Rev Microbiol P 33(1): 67-87 (2007).

C

- Corpet D, Dangers Biologiques des Aliments – TIAC à Bactéries et virus, Intro, Fréquence P 5-6-24-25-26 (2014).

D

- Daouna G, Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale dans les filets de sole étude comparative des méthodes d'analyses et des résultats de deux laboratoires (2002).

J

- Jdily F, Les glaces ne séduisent toujours pas les foyers marocains, L'ECONOMISTE (2010)
- Jdily , La Gaztte du Maroc (2008).

K

- Kadiri Y M, Communication orale (2015).

L

- Louis J UQ, Microbiologie Alimentaire Contrôle microbiologique des Aliments Manuel Technique polytechnique Département STIA P 2-10-11-40-42-43-51-52 (2007).
- L'ECONOMISTE, Édition N° 138 du 14/07/1994.
- L'ECONOMISTE, Fatima El O G-Ice s'installe au Maroc (2007).

M

- Mathlouhi et MC B R, Les crèmes glacées, Dossier CEDUS avec la collaboration de l'Université de Reims. P 3-4.
- Marshall R.T. & Arbukle W.S Ice Cream, 5th edition, Chapman & Hall, N.Y (1996).
- Mdidech J. toxications alimentaires au Maroc : 18 000 cas déclarés en 20 ans La Vie éco (2011)

O

- Ouammi L, Rhalem N, Aghandous R, Semllali I, Badri M, Jalal G, Benlarabi S, Mokhtari A, Soulaymani A, Soulaymani-Bencheikh R, Profil épidémiologique des intoxications au Maroc de 1980 à 2007. Toxicol Maroc, pp 8–13 (2009).

- OUAMMI L, AOUED L, BENLARABI S, et SOULAYMANI R, Maladies d'origine alimentaire : Données du Centre Anti Poison du Maroc (1989-2008). Toxicologie Maroc 6: 7-10 (2010).
- Ojokoh AO. Microbiological Examination of Ice Cream Sold in Akure. Pakistan Journal of Nutrition 5(6): 536-8 (2006).
- Ourgha N, Evaluation de la qualité hygiénique des glaces et des crèmes glacées commercialisées dans la ville de Fès P 34, 35 (2014)

P

- PÉRIAULT A, Sorbet ou crème glacée : faites-vous plaisir sans complexer...
- Poutrel B, - Les staphylocoques et les streptocoques de mammites. In Les groupes microbiens d'intérêt laitier. CEPIL, Paris, 415-453 (1992).

R

- Rapin A, Les Glaces, Haute école de santé Genève Filière Nutrition et diététique P 2-3 (2013).

Y

- Yaman H, Elmali M, Ulukanli Z, Tuzcu M, Genctav K. Microbial quality of ice cream sold openly by retail outlets in Turkey. Revue Med V et 157(10):457-462 (2006).

Webographies

- <http://onssa.gov.ma/fr/index.php> (Consulté tout au long du projet)
- <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/securit/ill-intox/index-fra.php> (Consulté le 22 avril 2015)
- <http://canadienssante.gc.ca/eating-nutrition/poisoning-intoxication/salmonella-salmonelle-fra.php> (Consulté le 22 avril 2015)
- <http://canadienssante.gc.ca/eating-nutrition/poisoning-intoxication/listeriosis-listeria-listeriose-fra.php> (Consulté le 22 avril 2015)
- <http://www.lavieeco.com/news/societe/intoxications-alimentaires-au-maroc-18-000-cas-declares-en-20-ans-19650.html> (Consulté le 24 avril 2015)
- <http://www.lanutrition.fr/bien-dans-son-assiette/aliments/sucre-et-produits-sucres/glaces-et-sorbets/sorbet-ou-creme-glacee-faites-vous-plaisir-sans-complexer.html> (Consulté le 29 avril 2015)
- <http://informationsnutritionnelles.fr/creme-glacee> (Consulté le 1 mai 2015)
- <http://fr.slideshare.net/boubnbadri/atelier-se-prsentation-directeur> (Consulté le 1 mai 2015)
- <http://www.leconomiste.com/article/cremes-glacees-les-producteurs-veulent-en-finir-avec-la-saisonnalite> (Consulté le 1 mai 2015)

Annexe 1

Les normes

NM ISO 17025

L'ISO 17025 contient l'ensemble des exigences que les laboratoires doivent respecter pour démontrer à leurs clients et aux autorités réglementaires qu'ils appliquent un système de management leur permettant de maîtriser entièrement leurs processus, qu'ils ont la compétence technique et sont aptes à produire des résultats techniquement valides. Les organismes d'accréditation chargés de reconnaître la compétence des laboratoires utiliseront la norme comme base de leur accréditation.

L'ISO 17025 contient toutes les exigences auxquelles doivent satisfaire les laboratoires d'essais et d'étalonnage s'ils entendent apporter la preuve qu'ils gèrent un système qualité. Ses objectifs : Etablir les précisions générales permettant de reconnaître un laboratoire d'essai ou d'étalonnage comme compétent et fiable. Afin de faciliter son accréditation, d'établir la confiance entre les laboratoires et de favoriser les échanges internationaux 'informations et d'expériences. Ainsi qu'accentuer l'harmonisation des normes et des procédures au niveau international.

EN 45001

La norme EN 45001 définit les critères d'accréditation des laboratoires par le COFRAC. Elle est complétée par les différentes règles internes au COFRAC, elle couvre les domaines suivants, dans la méthode « fonctionne » : Domaines d'analyses précis pour lesquels la certification est demandée, Objectifs qualité que se fixe le laboratoire, Identité juridique, Impartialité, indépendance et intégrité, Gestion et organisation, Système qualité, compétence et formation du personnel, y compris stagiaires, Locaux et équipement, procédures et normes d'analyses, pour l'ensemble des analyses que peut assurer le laboratoire, Rapports d'essai, Enregistrement interne des analyses, Confidentialité et sûreté, Dispositions adoptées dans le cas de sous-traitances pour assurer le respect de la norme, Coopération, Obligations résultant de l'accréditation.

NM ISO 4833-1

La présente partie de l'ISO 4833 spécifie une méthode horizontale de dénombrement des microorganismes capables de se développer et de former des colonies dans un milieu solide après incubation aérobie à 30 °C. La méthode est applicable : aux produits destinés à la consommation humaine et aux aliments pour animaux ; aux échantillons d'environnement dans le domaine de la production d'aliments destinés à l'homme ou aux animaux et de la préparation des aliments. La présente partie de l'ISO 4833 est applicable : aux produits qui exigent un comptage fiable lorsqu'une limite inférieure de détection est spécifiée (inférieure à 102/g ou 102/ml pour des échantillons liquides ou inférieure à 103/g pour des échantillons solides) ; aux produits supposés contenir des colonies envahissantes qui masquent les colonies d'autres organismes, par exemple le lait et les produits laitiers susceptibles de contenir diverses espèces envahissantes de Bacillus. La présente partie de l'ISO 4833 peut ne pas être adaptée à l'analyse de certains aliments fermentés et aliments pour animaux et d'autres milieux ou conditions d'incubation peuvent être plus appropriés. Toutefois, cette méthode peut être appliquée à de tels produits même si elle ne détecte pas totalement les microorganismes présents en majorité dans ces produits. Pour certaines matrices, la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 4833 peut donner des résultats différents de ceux obtenus avec la méthode spécifiée dans l'ISO 4833-2.

NM ISO 6888-2

La présente partie de l'ISO 6888 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues en milieu solide (milieu au plasma de lapin et au fibrinogène) après incubation en aérobie à 35°C ou 37°C.

NM ISO 6579

La présente norme internationale spécifie une méthode horizontale de la recherche des Salmonella, incluant Salmonella Typhi et Salmonella paratyphi. La présente norme est applicable aux : produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, échantillons environnementaux dans le domaine de la production et de la manutention de produits alimentaire.

La norme NM ISO 6579 est la méthode horizontale de référence pour la détection de *Salmonella* spp. Dans une denrée alimentaire, mais également dans des échantillons d'environnement collectés dans les entreprises agro-alimentaires (Association Française de Normalisation, 2002). Dans sa nouvelle version (2002), le sélénite-cystine a été remplacé par le milieu Muller Kauffman tétrathionate novobiocine (MKTTn), le Rappaport Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé à la place de la formule simple milieu (Bager et Petersen, 1991).

Les méthodes prévoient ensuite un isolement, qui consiste en un étalement sur boîte de Pétri, contenant également des milieux sélectifs.

NM ISO 11290-1

La présente partie de l'ISO 11290 prescrit une méthode horizontale pour la recherche de *Listeria monocytogenes*. La présente partie de l'ISO 11290 est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

Annexe 2

Milieux de culture

Plate Count Agar au lait (PCA)

Composition

_ Digestat enzymatique de caséine	5,0 g
_ Poudre de lait écrémé.....	1,0 g
_ Extrait de levure	2,5 g
_ Glucose anhydre (C ₆ H ₁₂ O ₆)	1,0 g
_ Gélose ^a	9 g à 18 g
_ Eau Distillée	1000 ml

^a : En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.

Violet-Red-Bile-Lactose (VRBL)

Composition

_ Digestat enzymatique de tissus animaux	7 g
_ Extrait de levure	3 g
_ Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ; H ₂ O)	10 g
_ Chlorure de Sodium	5 g
_ Sels biliaires	1,5 g
_ Rouge neutre	0,03 g
_ Cristal Violet	0,002 g
_ Agar-Agar ^a	12 g à 18 g
_ Eau Distillée	1000ml

^a : Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar

Eau Peptonée Tamponnée (EPT)

Composition

_ Digestat enzymatique de caséine	10,0 g
_ Chlorure de Sodium.....	5,0 g
_ Sodium hydrogénophosphate dodécahydraté ($\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
_ Hydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4)	1,5 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Bouillon Rappaport-Vassiliadis avec soja (bouillon RVS) = 1000 ml de
la solution A + 100 ml de la solution B + 10 ml de la solution C

Composition

Solution A

_ Digestat enzymatique de soja	5,0 g
_ Chlorure de Sodium	8,0 g
_ Hydrogénophosphate de Potassium (KH_2PO_4)	1,4 g
_ Potassium hydrogénophosphate (K_2HPO_4)	0,2 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Solution B

_ Chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$)	400,0 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Solution C

_ Oxalate de vert de malachite	0,4 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Bouillon Muller-Kauffman au tétrationate-novobiocine (MKTTn)

Composition

_ Extrait de viande	4,3 g
_ Digestat enzymatique de caséine	8,3 g
_ Chlorure de sodium (NaCl)	2,6 g
_ Carbonate de sodium (CaCO ₃)	38,8 g
_ Thiosulfate de sodium pentahydraté (Na ₂ S ₂ O ₃ , 5H ₂ O)	47,8 g
_ Sels biliaires à usage bactériologique	4,78 g
_ Vert brillant	9,6 mg
_ Eau Distillée	1000 ml

Au moment de l'emploi on ajoute : 0,2 ml / 10ml de la solution d'Iode + 0,1 ml / 10 ml de novobiocine

Gélose Xylose Lysine Désoxycholate (XLD)

Composition

_ Extrait de levure en poudre	3,0 g
_ Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
_ Xylose	3,75 g
_ Lactose	7,5 g
_ Saccharose	7,5 g
_ Hydrochlorure de L-Lysine	5,0 g
_ Thiosulfate de sodium	6,8 g
_ Citrate d'ammonium-fer (III)	0,8 g
_ Rouge de phénol	0,08 g
_ Désoxycholate de sodium	1,0 g
_ Gélose	9 g à 18 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Brillant-Green-Agar (BGA)

Composition

_ Extrait de levure	3,0 g
_ Peptone de protéose Bacto	10,0 g
_ Lactose	10,0 g
_ Saccharose	10,0 g
_ Chlorure de sodium	5,0 g
_ Rouge de phénol	0,08 g
_ Gélose	20,0 g
_ Vert brillant	12,5 g

Gélose au citrate de fer et aux trois sucres (TSI)

Composition

_ Extrait de viande	3,0 g
_ Extrait de levure	3,0 g
_ Peptone	20,0 g
_ Chlorure de sodium	5,0 g
_ Lactose	10,0 g
_ Saccharose	10,0 g
_ Glucose	1,0 g
_ Citrate de fer (III)	0,3 g
_ Thiosulfate de sodium	0,3 g
_ Rouge de phénol	0,024 g
_ Gélose ^a	9 g à 18 g
_ Eau Distillée	1000 ml

^a: En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.

Gélose de Braid-Parker + plasma de lapin et fibrinogène (RPF)

Composition

_ Tryptone	10,0 g
_ Extrait de viande	5,0 g
_ Extrait autolytique de levure	1,0 g
_ Pyruvate de sodium	10,0 g
_ Glycine	12,0 g
_ Chlorure de lithium	5,0 g
_ Agar agar bactériologique	15,0 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Pour 90 ml de milieu de base on ajoute 10 ml de supplément Plasma de Lapin
Fibrinogène reconstitué (BS034)

Bouillon Fraser-demi

Composition

_ Polypeptone.....	10,0 g
_ Extrait autolytique de levure	5,0 g
_ Extrait de viande	5,0 g
_ Chlorure de sodium.....	20,0 g
_ Phosphate disodique anhydre.....	9,6 g
_ Phospahte Monopotassique.....	1,35 g
_ Esculine	1,0 g
_ Chlorure de lithium	3,0 g
_ Acide anlidixique	10,0 mg
_ Acriflavine (chlorhydrate)	12,5 mg
_ Citrate de fer III ammoniacal.....	0,50 g
_ Eau Distillée	1000 ml

On ajoute 2,25 ml d'une solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5% BS059 ou BS062 Bouillon de Fraser-demi base.

La seule différence de concentration en acide nalidixique et en acriflavine des bouillons de Fraser-demi et de Fraser.

Bouillon Fraser

Composition

_ Polypeptone.....	10,0 g
_ Extrait autolytique de levure	5,0 g
_ Extrait de viande	5,0 g
_ Chlorure de sodium.....	20,0 g
_ Phosphate disodique anhydre.....	9,6 g
_ Phospahte Monopotassique.....	1,35 g
_ Esculine	1,0 g
_ Chlorure de lithium	3,0 g
_ Acide anlidixique	20,0 mg
_ Acriflavine (chlorhydrate)25 mg
_ Citrate de fer III ammoniacal.....	0,50 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Dans chaque tube de bouillon Fraser de base nous ajoutons aseptiquement 0,1 ml d'une solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5% BS059 ou BS062.

Gélose ALOA

Composition

_ Digestat enzymatique.....	18,0 g
_ Digestat enzymatique de caséine	6,0 g
_ Extrait de levure	10,0 g
_ Pyruvate de sodium.....	2,0 g
_ Glucose.....	2,0 g
_ Glycérophosphate de magnésium.....	1,0 g
_ Sulfate de magnésium	0,5 g
_ Chlorure de sodium.....	5,0 g
_ Chlorure de lithium	10,0 g
_ Hydrogenophosphate disodique anhydre	2,5 g
_ X-glucoside.....	0,05 g
_ Acide nalidixique	0,02g
_ Cefazidime.....	0,02 g
_ Polymixine B.....	76700 U
_ Amphotéricine B.....	0,01 g
_ Phosphatidylinostol.....	2g
_ Agar.....	13,5 g
_ Eau Distillée	1000 ml

Gélose Palcam

Composition

_ Bacto Columbia Blood Agar Base	39,0 g
_ Mannitol	10,0 g
_ Glucose	0,5 g
_ Esculine.....	1,0 g
_ Citrate d'ammonium ferrique.....	0,5 g
_ Chlorure de lithium	15,0 g
_ Rouge de phénol	0,08 g
_ HCl d'acriflavine.....	0,005 g
_ Sulfate de polymyxine B	0,01 g
_ Cefazidime	0,008 g
_ Gélose Bacto.....	2,0 g
_ Cefazidime.....	0,008 g
_ Eau Distillée	1000 ml