



Ministère de l'Enseignement Supérieur et  
de la Recherche Scientifique  
UNIVERSITE ABOUBEKR BELKAID 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'Agroalimentaire,  
au Biomédical et à  
l'Environnement  
مخبر الميكروبيولوجيا التطبيقية  
للاغذية، للبيوطبي والبيئة



# ***THESE***

*Présentée par*  
**MEZIAN Larbi**

*En vue de l'obtention du diplôme de*  
**Doctorat en Biologie**  
*Option : Microbiologie Appliquée*

## **Identification et caractérisation de la flore aérobie sporulée inféodée aux poudres de lait infantile commercialisées en Algérie**

*Présentée devant le jury composé de :*

<b>HASSAÏNE Haféda</b>	<b>Professeur Univ. Tlemcen</b>	<b>Présidente</b>
<b>BARKA Med Salih</b>	<b>Professeur Univ. Tlemcen</b>	<b>Examineur</b>
<b>BENDALI Farida</b>	<b>Professeur Univ. Béjaïa</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>MAMI Anas</b>	<b>Professeur Univ Oran 1. Oran</b>	<b>Examineur</b>
<b>MOUSSA-BOUDJEMAA Boumédine</b>	<b>Professeur Univ. Tlemcen</b>	<b>Directeur de thèse</b>
<b>MOUSSAOUI Abdallah</b>	<b>Professeur Univ Béchar</b>	<b>Co-directeur de thèse</b>

**Année Universitaire 2022 - 2023**



# *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<sup>f</sup>. **Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA**, Professeur de Microbiologie au département de Biologie, Université de Tlemcen, ainsi que le Laboratoire de Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaire dans les zones semi-arides (VRVSA) sous la direction de M<sup>f</sup>. **Abd Allah Moussaoui** Professeur de Microbiologie à l'université Tahri Mohamed à Bechar.

À l'étranger, en Italie des travaux ont été aussi réalisés au Département de Recherche Translationnelle et Nouvelles Technologies en Médecine et Chirurgie, sous la direction de M<sup>me</sup> **Emilia Ghelardi** Professeur de Microbiologie et microbiologie clinique à l'Université of Pisa. Au Brésil, au Laboratoire de Microbiologie Quantitative des Aliments de la Faculté de Génie Alimentaire sous la direction de M<sup>f</sup>. **Anderson Sant'Ana** Professeur de microbiologie alimentaire à l'université de Campinas UNICAMP, Sao Paulo au Brésil, et au Laboratoire du Département Chimie Organique de L'institut de Chimie sous la direction de M<sup>me</sup> **Anita Jocelyne Marsaioli** professeur de Biochimie et la Chimie organique à Institut de chimie à l'université de Campinas UNICAMP Sao Paulo au Brésil.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance au Professeur **Boumediene MOUSSA BOUDJEMAA**, mon Directeur de thèse, qui tout au long de ces années, m'a suivi et encouragé. Je tiens à le remercier pour son infinie patience et pour la très grande liberté qu'il m'a accordée dans la conduite de ce travail. Les discussions que nous avons eues et les conseils qu'il m'a prodigués se sont toujours révélés fructueux et formateurs. Pour tout cela, je tiens à lui témoigner toute ma gratitude et mon profond respect.

J'adresse également toute ma gratitude ainsi que mes plus sincères remerciements au Professeur **Abd Allah Moussaoui**, mon Co-directeur de thèse pour m'avoir fait l'honneur de codiriger ce travail. Je lui suis reconnaissant pour la confiance et le soutien permanent qu'il m'a témoignée ainsi que pour ses compétences scientifiques et pédagogiques qui m'ont permis de bien mener cette thèse.

J'exprime toute ma gratitude et mes vifs remerciements à M<sup>me</sup> **HASSAINE Hafida**, Professeur à l'université de Tlemcen, qui a bien accepter de présider ce jury.

J'adresse également tous mes remerciements à M<sup>f</sup> **BARKA Med Salih** Professeur à l'université de Tlemcen, Mme **BENDALI Farida** Professeur à l'université de Béjaïa et M<sup>f</sup> **MAMI Anas** Professeur à U. S. T. Oran pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu porter à ce travail et d'avoir accepté d'en être les examinateurs.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance et mes vifs remerciements au Professeur **Anderson Sant'Ana**, directeur du Laboratoire de Microbiologie Quantitative des Aliments à l'université de Campinas au Brésil de m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour son aide précieuse, pour ses conseils, ses encouragements et qui m'a offert les meilleures conditions pour les bons déroulements de toutes les analyses fines et les expériences de ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de mon profond respect et l'expression de mes vifs remerciements

Un grand merci au Professeur **Anita Jocelyne Marsaioli** et le docteur **José Matheus Bonatto** de l'Institut de chimie à l'université de Campinas au Brésil, de m'avoir également accueilli au sein de leur équipe, et qui ont mis à ma disposition tous les moyens nécessaires pour la réalisation de la technique MALDI-TOF MS dans cette étude.

Mes vifs remerciements vont également au Professeur **Emilia Ghelardi** de l'université de Pisa en Italie, pour son aide précieuse. Qu'il me soit permis de lui prouver ma profonde reconnaissance pour sa contribution à la réalisation de ce travail.

Ma profonde gratitude s'adresse également aux membres du laboratoire **LAMAABE** à l'université de Tlemcen en particulier l'équipe n°4, tous les membres du laboratoire **VRVSA** ainsi que tous les ingénieurs et personnel du laboratoire de pédagogie de l'université Béchar, qui m'ont offert une ambiance scientifique propice pour l'accomplissement de ce travail.

Je tiens à adresser mes profonds remerciements pour mon oncle **SAID** et mon cousin **HOCINE** pour toute l'aide et le soutien qu'ils m'ont apportés durant les sept ans de recherche, en suivant l'évolution de cette étude à toutes les étapes et en donnant le meilleur à chaque fois qu'ils sont sollicités.

Mes vifs remerciements vont également à ma chère épouse **SIHAM** pour le grand soutien qu'elle m'a apporté tout au long de ces années de recherche, qui n'a jamais cessé d'alimenter mon courage, mon enthousiasme et ma force morale.

Je remercie enfin toute ma famille et tous mes amis, ainsi que ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé à l'élaboration de ce travail scientifique.

# *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail*

*A mes chers parents,*

*A ma chère épouse SIHAM,*

*A mes chers enfants IDRIS & BADIS,*

*A mes chers frères READ, ZOUBIR & BOUBKEUR,*

*Ainsi qu'à toutes mes nièces et mes neveux,*

*A toute la Famille MEZIAN.*

## ملخص

حليب الأم هو أفضل مصدر غذائي لحديثي الولادة والرضع، ومع ذلك، عندما يكون غير كافٍ أو غير متوفر، يلجأ الآباء إلى حليب الأطفال المجفف. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم تعداد وتوصيف التنوع البيولوجي للبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ في حليب الأطفال المجفف. لهذا، تم تحليل أربعة وخمسين عينة (n = 54) لثلاث علامات تجارية قصد البحث عن البكتيريا الهوائية الكلية والبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ. تم التعرف على البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ المعزولة بواسطة تقنية MALDI-TOF MS. كما تم تقييمها لقدرتها على إنتاج إنزيمات التلف والنشاط الانحلالي، ثم بعد ذلك، تم إخضاع العزلات لنوع الجين *rpoB* وتقييم الجينات السامة *bceT*، *entFM*، *nhe*، *hbl* و *cytK*. الأنواع الرئيسية المعزولة كانت *licheniformis* *Bacillus* 54%، تليها *Bacillus cereus* 33% و *Bacillus subtilis* 5%. يتراوح عدد البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ من 1 إلى  $4 \log_{10}$  g/CFU، وكان المتوسط  $2.9 \log_{10}$  g/CFU للبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ معتدلة الحرارة و  $2.5 \log_{10}$  g/CFU للبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ الحرارية. أظهرت معظم عينات الحليب المدروسة عدداً للبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ معتدلة الحرارة ولبكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ الحرارية بين  $2$  و  $3 \log_{10}$  g/CFU من جهة أخرى، 13% و 50% و 37% من العينات كان لديها تعداد البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ  $2 > \log_{10}$  g/CFU، بين  $2-3 \log_{10}$  g/CFU وبين  $3-4 \log_{10}$  g/CFU على التوالي. وكان 97% لديها بروتياز، 84% أميلاز، 66% كان لها نشاط انحلالي للدم، و 61% كان لديها نشاط ليسيثيناز. 44 من أصل 120 عذلة تحتوي على جين سام واحد على الأقل، حيث احتوت *B. cereus* على 56%، *B. licheniformis* 34% وأقل من 5% لكل من *B. subtilis* و *B. pumilus* و *L. sphaericus*. حملت جميع عزلات *B. cereus* الجين *nhe*، *entFM* 60%، *cytK* 44%، *bceT* 32% و *hbl* 28%. بالإضافة إلى ذلك، فإن 17% من بكتيريا *B. licheniformis* احتوت على بعض هذه الجينات السامة. كانت نسبة صغيرة من بكتيريا *B. subtilis* و *B. pumilus* و *L. sphaericus* تحمل جينات سامة أيضاً. قدمت شجرة النشوء و التطور القائمة على *rpoB* دقة عالية بين أنواع البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ. تقدم نتائج هذه الدراسة نظرة واسعة للتنوع البيولوجي الظاهري والجيني للعصيات الموجودة في حليب الأطفال المجفف المباع في الجزائر.

## الكلمات المفتاحية:

جراثيم العصيات؛ مسحوق حليب أطفال؛ جينات التسمم؛ باسيلوس؛ باني باسيلوس.

## Abstract

Breast milk is the best source of nutrients for newborns and infant, however, when breastfeeding is not sufficient or possible, parents feed them by powdered infant formula (PIF). This study aimed to assess the counts and biodiversity characterization of aerobic sporeforming bacteria (ASB) in powdered infant formula. Fifty-four (n=54) PIF samples of three brands were analyzed for mesophilic aerobic bacteria and ASB counts. ASB isolated from PIF identified by MALDI-TOF mass spectrometry and were assessed for their ability to produce spoilage enzymes and hemolytic activity. Then, the isolates were subjected to *rpoB* gene typing and assessment of *bceT*, *entFM*, *nhe* (A, B, C), *hbl* (A, B, C) and *cytK* toxin genes. The main species isolated were *Bacillus. licheniformis* (54%), followed by *Bacillus. cereus* (33%) and *Bacillus. subtilis* (5%). The ASB counts ranged from 1 to 4 log CFU/g, and the mean was 2.9 log CFU/g for mesophilic aerobic sporeforming bacteria (MSC) and 2.5 log CFU/g for thermophilic aerobic sporeforming bacteria (TSC). Most PIF samples presented MSC and TSC counts between 2 and 3 log CFU/g. A total of 13%, 50%, and 37% of the samples presented MSC counts from <2 log CFU/g, between 2-3 log CFU/g and between 3-4 log CFU/g, respectively. Among the ASB isolates, 97% had protease, 84% hydrolyzed starch, 66% had hemolytic activity, and 61% had lecithinase activity. 44 from 120 isolates harbored at least one toxin gene; 57% for *B. cereus*, 34% for *B. licheniformis*, 4.5% for *B. subtilis*, 2.3 for *B. pumilus*, and 2.3% for *L. sphaericus*. All *B. cereus* isolates harbored the *nhe* gene, 60% *entFM*, 44% *cytK*, 32% *bceT*, and 28% *hbl* genes. Besides, 17% of *B. licheniformis* harbored *nhe*. A small proportion of *B. subtilis*, *B. pumilus*, and *L. Sphaericus* carried toxin genes. The *rpoB* based phylogenetic tree provided high resolution among *Bacillus* species. The findings of this study provide insights into the phenotypic and genotypic biodiversity of *Bacillus* present in PIF marketed in Algeria.

**Keywords:** Aerobic sporeforming bacteria; Powdered infant formula; toxin genes; *Bacillus*;

## Résumé

Le lait maternel est la meilleure source de nutriments pour les nouveau-nés et les nourrissons, cependant, lorsqu'il n'est pas suffisant ou disponible, les parents ont recours à la poudre de lait infantile (PLI). Cette étude visait à évaluer le dénombrement et la caractérisation de la biodiversité des bactéries aérobies sporulées (BAS) dans la PLI. Cinquante-quatre (n = 54) échantillons de PLI de trois marques ont été analysés pour les bactéries aérobies mésophiles totale (FMAT) et les BAS. Les BAS isolées à partir des PLI ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF et ont été évaluées pour leurs capacités à produire des enzymes de détérioration et leur activité hémolytique. Ensuite, les isolats ont été soumis au typage du gène *rpoB* et à l'évaluation des gènes de toxine *bceT*, *entFM*, *nhe* (A, B, C), *hbl* (A, B, C) et *cytK*. Les principales espèces isolées étaient *Bacillus licheniformis* (54 %), suivi de *Bacillus cereus* (33 %) et *Bacillus subtilis* (5 %). La charge des BAS variaient de 1 à 4 log UFC/g, et la moyenne était de 2,9 log UFC/g pour les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et de 2,5 log UFC/g pour les bactéries aérobies sporulées thermophiles (BAST). La plupart des échantillons de la PLI présentaient des charges de BASM et de BAST entre 2 et 3 log UFC/g. Un total de 13 %, 50 % et 37 % des échantillons présentaient des comptages de BASM < 2 log UFC/g, entre 2-3 log UFC/g et entre 3-4 log UFC/g, respectivement. Parmi les isolats des BAS, 97 % avaient une protéase, 84 % de l'amylase, 66 % avaient une activité hémolytique et 61 % avaient une activité lécithinase. Au total, 44 isolats sur 120 abritaient au moins un gène de toxine, 57 % pour *B. cereus*, 34 % pour *B. licheniformis*, 4.5% pour *B. subtilis*, 2.3% pour chaque'une de *B. pumilus* et *Lysinibacillus sphaericus*. Tous les isolats de *B. cereus* portaient le gène *nhe*, 60 % *entFM*, 44 % *cytK*, 32 % *bceT* et 28 % *hbl*. Par ailleurs, 17% de *B. licheniformis* hébergeaient *nhe*. Une faible proportion de *B. subtilis*, *B. pumilus* et *L. sphaericus* portaient des gènes de toxines. L'arbre phylogénétique basé sur *rpoB* a fourni une grande résolution parmi les espèces de *Bacillus*. Les résultats de cette étude donnent un aperçu sur la biodiversité phénotypique et génotypique des *Bacillus* présents dans les PLI commercialisée en Algérie.

**Mots clés:** Préparations pour nourrissons ; Poudres de lait infantile ; Bactéries aérobies sporulées; *Bacillus*; Gènes de toxines.



## Liste des abréviations

**AND** : acide désoxyribonucléique  
**ARN** : Acide ribonucléique ribosomique  
**ATCC**: American Type Culture Collection.  
**A<sub>w</sub>** : Activité d'eau.  
**B** : Bacillus.  
**BAS** : Bactéries aérobies sporulées  
**BASM** : Bactéries aérobies sporulées mésophiles  
**BAST** : Bactéries aérobies sporulées thermophiles.  
**BHI** : Brain Heart Infusion (Bouillon cœur-cerveille)  
**Bla** : β- lactamases  
**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool.  
**CAC** : Codex Alimentarius Commission  
**CE**: Communauté Européenne  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**BPF** : Bonnes Pratiques de Fabrication  
**dNTPs** :Deoxy Nucleotide Tri Phosphates  
**EFSA** : European Food Safety Authority  
**FAMT**: Flore Mésophile Aérobie Totale  
**FAO**: Food and Agriculture Organisation  
**FSAI**: Food Safety Authority of Ireland  
**g** : gramme  
**g** : gravité  
**GN**: Gélose nutritive  
**H** : heure  
**HACCP**: Hazard Analysis and Critical Control Points  
**ID** : Idenifiant  
**ISO**: International Organization for Standardization  
**JORA** : Journal officiel de la république Algérienne  
**Kb**: kilobase  
**kDa**: Kilo Dalton  
**Kpb** : Kilo Paire de Base

**LAMAABE:** Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et à l'Environnement (Université de Tlemcen, Algérie)

**log<sub>10</sub>:** Logarithme décimal

**MALDI-TOF MS:** Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry

**Min :** minute

**mL :** Millilitre

**mM :** Milimolaire

**NBCI:** National Center for Biotechnology Information

**NHS:** National Health Service

**Ng:** Nano gramme

**Nhe :** Non-Haemolytic Enterotoxin.

**NR+ :** Nitrate positive

**OCDE :** Organisation coopération et de développement économiques

**OMS :** Organisation Mondiale de la Santé

**PCA:** Plat Count Agar

**PCR:** Polymerase chain reaction

**pH:** Potentiel hydrogène

**PLI :** poudre de lait infantile.

**PLS-DA :** Partial Least-Squares Discriminant Analysis

**CCP :** Critical control point (Point critique pour la maîtrise)

**PHE:** Public Health England

**Sp:** species

**Spp:** several species.

**Taq:** Taq (Thermus aquaticus) polymerase

**TSE:** Tryptone Sel eau

**TAE :** Tris, Acétate, EDTA

**U:** Unité

**UBIC:** Unified Building Industry Classification

**UFC:** unité formant colonie.

**UK:** united Kingdom

**UNICEF:** United Nations International Children's Emergency Fund

**USDEC:** United States Dairy Export Council (USDEC)

**UV :** Ultra Violet

**V** : volt

**V/V** : Volume à volume

**VRVSA** : Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaire dans les zones semi-arides

**WHO**: World Health Organization

**β** : Beta.

**μM** : Micromolaire

**%** : Pourcentage

**~** : à peu près égal à

**μg** : Micro gramme

**μL** : Microlitre

## Liste des figures

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
<b>Figure 01 :</b>	Organigramme pour la production et l'utilisation de préparations en poudre pour nourrissons	<b>10</b>
<b>Figure 02:</b>	Plan d'échantillonnage des PLI de trois marques	<b>29</b>
<b>Figure 03:</b>	Préparation des dilutions et l'ensemencement des boites de Pétri pour le dénombrement de la FMAT	<b>30</b>
<b>Figure 04 :</b>	Préparation des dilutions et l'ensemencement des boites de Pétri pour le dénombrement des spores aérobies	<b>31</b>
<b>Figure 05:</b>	Obtention des isolats par la technique des quadrants d'appauvrissement de la culture	<b>32</b>
<b>Figure 06 :</b>	Mise en place des colonies sous forme de spot sur la matrice MALDI TOF et l'ajout de la solution matricielle	<b>42</b>
<b>Figure 07 :</b>	Mise en place de l'échantillon d'ADN pour la quantification.	<b>44</b>
<b>Figure 08:</b>	Affichage des résultats après la mesure de l'échantillon d'ADN.	<b>45</b>
<b>Figure 09 :</b>	Distribution des charges de FMAT ( $\log_{10}$ cfu/g), BASM et BAST ( $\log_{10}$ spore/g) au sein des échantillons de la PLI des trois marques.	<b>52</b>
<b>Figure 10:</b>	Différents aspects morphologiques de colonies de la flore aérobie sporulée inféodée aux poudres de lait infantiles commercialisées en Algérie	<b>60</b>
<b>Figure 11:</b>	Aspect d'un isolat obtenu de la PLI-1 après une coloration de Gram	<b>62</b>
<b>Figure 12:</b>	Observation microscopique des spores à l'état frais	<b>63</b>
<b>Figure 13:</b>	Aspect microscopique des spores d'un isolat obtenu de la PLI-2 après un examen à l'état frais (A), après coloration au vert de malachite (B) et après la coloration de bleu de méthylène (C).	<b>63</b>
<b>Figure14 :</b>	Tests d'activité hydrolytique et hémolytique des isolats.	<b>64</b>
<b>Figure15 :</b>	Taux de production d'enzymes extracellulaires et l'hémolyse des isolats.	<b>65</b>
<b>Figure16 :</b>	Nombre de gènes de toxicité détectés pour chaque espèce	<b>74</b>
<b>Figure 17:</b>	La distribution des gènes au sein des différentes marques de PLI	<b>76</b>
<b>Figure 18 :</b>	Scores de projection (VIP) des gènes de toxicité étudiés	<b>77</b>
<b>Figure 19 :</b>	Arbre phylogénétique du typage par le séquençage du gène <i>rpoB</i>	<b>80</b>
<b>Figure 20 :</b>	Photos des résultats de l'antibiogramme.	<b>84</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>		<b>Page</b>
<b>Tableau01 :</b>	Incidence de <i>Cronobacter</i> spp. et <i>Cronobacter sakazakii</i> dans la PLI	<b>16</b>
<b>Tableau 02 :</b>	Incidence des Salmonella inféodés à la PLI et impliqués dans des cas d'infections dans certains pays	<b>17</b>
<b>Tableau 03 :</b>	Incidence de bactéries pathogènes inféodées aux PLIs dans quelques pays	<b>17</b>
<b>Tableau 04 :</b>	Incidence des <i>Bacillus</i> spp. dans la PLI	<b>19</b>
<b>Tableau05 :</b>	Les amorces des gènes de virulences ciblés dans cette étude	<b>46</b>
<b>Tableau 06 :</b>	Résultats du test de Duncan pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), des bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et des bactéries aérobies sporulées thermophile (BAST) dans les poudres de lait infantiles PLI-1, PLI-2 et PLI-3.	<b>50</b>
<b>Tableau 07:</b>	Résultats du test de Duncan pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les bactéries sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries sporulées thermophile (BAST) dans trois marques par rapport aux deux âges de la PLI.	<b>51</b>
<b>Tableau 08 :</b>	Identification des bactéries aérobies sporulées isolés de trois marques de PLI commercialisées en Algérie	<b>68</b>
<b>Tableau 09 :</b>	L'incidence des bactéries aérobies sporulées mésophiles et les bactéries aérobies sporulées thermophiles dans la PLI par rapport à l'âge et la marque.	<b>69</b>
<b>Tableau 10 :</b>	Résultats de l'antibiogramme des souches isolées de la PLI.	<b>84</b>

# Table des matières

Introduction générale	1
<b>Partie Synthèse bibliographique</b>	
<b>I. Le lait infantile</b>	<b>4</b>
I. 1. Introduction	4
I. 2. Lait maternel et ses bienfaits	4
I. 3. Substitut du lait maternel	5
I. 3.1. Historique	6
I. 3.2. Les trois grandes classes de lait infantiles	7
I. 3.2.1. Poudre de lait infantile (1ère âge)	7
I. 3.2.2. Poudre de lait infantile (2ème âge)	7
I. 3.2.3. Poudre de lait infantile (3ème âge) ou laits de croissance	8
I. 3.3. Statistiques relatives au marché des préparations pour nourrissons	8
I. 3.4. Fabrication des poudres de lait infantile	9
I. 3.4. 1. Procédé de mélange à sec	10
I. 3.4.2. Procédé de mélange humide.	11
I. 3.4.3. Procédé combiné.	12
<b>II. Contamination microbienne des poudres de lait infantiles (PLI)</b>	<b>12</b>
II. 1. Qualité bactériologique et contaminants bactériens des PLIs	12
II. 2. Sources de contamination bactérienne des PLIs	13
II. 3. Bactéries pathogènes isolées des PLIs	15
II. 3. 1. Bactéries pathogènes non sporulées isolées des PLIs	16
II. 3. 1. 1. <i>Cronobacter</i> spp.	16
II. 3. 1.2. <i>Salmonella</i> spp.	17
II. 3.1. 3. Autres bactéries pathogènes	17
II. 3. 2. Bactéries sporulées pathogènes	18
<b>III. La flore aérobie sporulée inféodée aux PLI</b>	<b>20</b>
III. 1. Genre <i>Bacillus</i>	20
III. 1. 1. Groupe <i>Bacillus cereus</i>	22
III. 1. 2. Groupe <i>Bacillus subtilis</i>	23
III. 1. 3. <i>Bacillus licheniformis</i>	23

III.	2 Toxicité de <i>Bacillus</i> spp. autres que <i>Bacillus cereus</i>	24
III.	3. Identification moléculaire de <i>Bacillus</i>	25
III.	4. Antibiorésistance de <i>Bacillus</i>	26
III.	5. Réglementation de <i>Bacillus</i> dans la PLI	27

## **Partie matériel et méthodes**

<b>I.</b>	<b>Echantillonnage de la poudre de lait infantile (PLI)</b>	<b>28</b>
I.	1. Étude de marché des PLI	28
I.	2. Prélèvement des échantillons de PLI	29
<b>II.</b>	<b>Analyses microbiologiques</b>	<b>29</b>
II.	1. Préparation des échantillons	29
II.	2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	30
II.	3. Dénombrement des spores aérobies	30
II.	4. Lecture et interprétation	31
II.	5. Obtention des isolats	32
II.	6. Conservation des isolats	33
II.	6.1. Cryoconservation	33
II.	6.2. Préparation des suspensions sporales	33
II.	7. Identification des isolats	34
II.	7.1. Identification macroscopique	34
II.	7.2. Identification microscopique	34
II.	7.2.1. Examen morphologique des isolats à l'état frais	34
II.	7.2.2. Coloration de Gram	34
II.	7.2.3. Coloration des spores bactériennes	35
II.	8. Tests biochimiques	36
II.	8.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires	36
II.	8.1. 1. Test de la catalase	36
II.	8.1. 2. Mise en évidence de l'oxydase	36
II.	8. 2. Type respiratoire	36
II.	8.3. Test « Mannitol mobilité »	37
II.	8.4. Recherche de nitrate réductase	37
II.	9. Mise en évidence de l'activité hydrolytique extracellulaire	37
II.	9.1. Recherche de l'amylase	38
II.	9.2. Recherche de la caséinase	38
II.	9.3. Recherche de la lécithinase	38
II.	10. Test d'hémolyse	38
II.	11. Utilisation des galeries API 20E	38

II.	12. Utilisation des galeries API 50 CHB	40
III.	<b>Réalisation d'un antibiogramme des isolats</b>	40
IV.	<b>Identification des isolats par la technique de MALDI-TOF MS</b>	41
V.	<b>Analyses moléculaires</b>	43
V.	1. Extraction de l'ADN génomique	43
V.	2. Quantification et vérification de la pureté de l'ADN	43
V.	3. Recherche des gènes de virulence	45
V.	3.1. Amplification par PCR	46
V.	3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%	47
V.	4. Typage des isolats par le séquençage du gène <i>rpoB</i>	47
V.	4.1. Amplification par PCR	47
V.	4.2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%	48
V.	4.3. Purification et séquençage	48
V.	4.4. Analyse phylogénétique	49
VI.	<b>Analyses statistiques</b>	49

## **Partie résultats et discussion**

I.	<b>Analyse microbiologiques</b>	50
I.	1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale	50
I.	2. Dénombrement des spores aérobies	54
I.	3. Caractérisation phénotypique des isolats	58
I.	3.1. Résultats des examens macroscopiques	58
I.	3.2. Résultats des examens microscopiques	62
I.	3.3. Mise en évidence des enzymes extracellulaires	64
II.	<b>Identification des isolats</b>	67
II.	1. Tests Biochimiques	67
II.	2. Identification des isolats par la technique MALDI- MS	67
III.	<b>Recherche des gènes de Toxine</b>	75
III.	1. Analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA)	73
IV.	<b>Typage moléculaire par le séquençage du gène <i>rpoB</i></b>	80
V.	<b>Antibiogramme</b>	83
	<b>Conclusion</b>	89
	<b>Références bibliographiques</b>	93
	<b>Annexes</b>	





# **Introduction Générale**

## *Introduction générale*

L'allaitement maternel joue un rôle déterminant pour le nouveau-né, en lui donnant tous les besoins nutritionnels pour une meilleure santé pendant les premiers mois de la vie (Ahern *et al.*, 2019). L'organisation mondiale de la santé recommande d'allaiter exclusivement au sein dans l'heure qui suit la naissance et pendant les six premiers mois (WHO, 2003), protégeant ainsi le nourissant de la morbidité et de la mortalité liées aux maladies infectieuses (Victora *et al.*, 2016).

Cependant, dans certains cas, le lait maternel peut être insuffisant ou indisponible, alors le recours à la poudre de lait infantile qui est proposée comme un substitut formulé pour imiter le maximum possible la composition nutritionnelle du lait maternel devient inévitable (Ahern *et al.*, 2019; Green et Shurley, 2016).

Le lait en poudre est un produit pratique en raison de sa longue durée de conservation et de sa facilité de stockage. La production mondiale de lait a augmenté de 1.6 % en 2018 pour s'établir à 838 Millions de tonnes (OCDE et FAO, 2019). Le marché mondial de la nutrition infantile a connu lui aussi une croissance significative durant cette dernière décennie, l'augmentation des ventes mondiales de la poudre de lait infantile entre 2014 et 2018 était de 30.4% (Baker *et al.*, 2016). Environ 2.7 Millions de tonnes de lait infantile, principalement commercialisé sous forme de poudre en 2017, avec une croissance prévisionnelle estimée à + 5 % /an entre 2018 et 2022 (Flamant, 2018).

L'Algérie est le premier consommateur de lait au Maghreb, avec une consommation de l'ordre de 140 L/habitant/an. Sur la consommation totale, qui est d'environ 5,5 Milliards de litres dont 3 Milliards de litres environ proviennent de l'importation. L'Algérie importe entre 260 000 à 300 000 tonnes de poudre de lait par an, pour une valeur qui avoisine un (01) Milliard d'euros, dont la part de lait infantile atteint 15 000 tonnes par an (Agroligne, 2015)

Cependant, l'augmentation de la production de poudres de lait peut créer des risques liés à la sécurité sanitaire (McHugh *et al.*, 2017). La poudre de lait infantile comme d'autres produits alimentaires ; peut contenir des micro-organismes dont certains peuvent nuire à la santé (Costa *et al.*, 2020; Chitrakar *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2018; Sadiq *et al.*, 2016; Chap *et al.*, 2009; Iversen et Forsythe, 2004). Ainsi, les poudres de lait infantile sont considérées comme une classe d'aliments à haut risque, en particulier après reconstitution, et peuvent contenir des bactéries pathogènes (Yang

## Introduction générale

*et al.*, 2017; Kent *et al.*, 2015; Haughton *et al.*, 2010; Forsythe, 2005) sachant que les nourrissons sont sensibles aux infections bactériennes (Vidic *et al.*, 2020; Costa *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2019; Cortese *et al.*, 2016; Hilliard *et al.*, 2003) en raison de leur faible système immunitaire (Vidic *et al.*, 2020; Ahern *et al.*, 2019; Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019; Townsend et Forsythe, 2008)

Le traitement thermique utilisé dans la fabrication de la poudre de lait infantile peut réduire la charge microbienne. Cependant, les bactéries sporulées peuvent survivre à ces traitements, germer et se développer après la reconstitution de la poudre de lait (Zhuang *et al.*, 2019 ; Alvarenga *et al.*, 2018 ; Cho *et al.*, 2018 ; McHugh *et al.*, 2017 ; Yang *et al.*, 2017; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1994).

Les bactéries du genre *Bacillus* sont omniprésentes et représentent l'un des groupes bactériens des plus répandus dans la nature, avec une grande diversité phénotypique et génotypique (Özdemir et Arslan, 2019; Peña *et al.*, 2014 ; Heyndrickx, 2011; From *et al.*, 2005). Ce genre comprend des espèces qui jouent un rôle important dans les maladies d'origine alimentaire et la détérioration des aliments (Özdemir et Arslan, 2019; Pia *et al.*, 2019 ; Oliveira *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016; Hwang et Park, 2015; Checinska *et al.*, 2015; De Jonghe *et al.*, 2010). Les bactéries du genre *Bacillus* représentent, en effet, une grande préoccupation pour l'industrie du lait, (Zhao *et al.*, 2020, Zhuang *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2007), et leur présence dans la poudre de lait infantile a été rapportée par plusieurs études (Sadek *et al.*, 2018; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1994).

La plupart des espèces de *Bacillus* sont considérées comme non pathogènes, à l'exception de *B. anthracis* et *B. cereus* (Gopal *et al.*, 2015). En particulier *B. cereus* semble être une espèce pathogène représentant de grands risques pour la transformation des produits laitiers et la santé publique (Zhao *et al.*, 2020; Zhuang *et al.*, 2019; Sadiq *et al.*, 2016; Kovac *et al.*, 2016; Hwang et Park, 2015; Scott *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 1994). En plus, *B. cereus* déjà été liée à plusieurs maladies graves chez les nourrissons (Pei *et al.*, 2018; Veysseyre *et al.*, 2015; Hilliard *et al.*, 2003). Cependant, d'autres espèces de *Bacillus* comme *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* également été associées à des pathologies d'origine

alimentaire (EFSA, 2016 ; Logan, 2012 ; Kramer et Gilbert, 1989), et ont été rapportées comme productrices d'entérotoxines et de toxines émétiques impliquées dans les maladies d'origine alimentaire (From *et al.*, 2007; From *et al.*, 2005; Rowan *et al.*, 2003 ; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999). Néanmoins, les données sur la qualité microbiologique des poudres de lait infantile restent limitées, principalement en ce qui concerne la diversité des bactéries sporulées aérobies (Kent *et al.*, 2016; Hwang et Park, 2015; Watterson *et al.*, 2014; Di Pinto *et al.*, 2013 ; Scott *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, la présente étude vise la recherche de la flore aérobie sporulée inféodée aux poudres de lait infantile commercialisées en Algérie, ainsi que la caractérisation phénotypique et génotypique des isolats, avec comme principal objectif l'évaluation de la diversité des bactéries aérobies sporulées dans ce produit. Une étude phylogénétique sera réalisée.

Ainsi, les objectifs assignés à cette thèse sont:

- D'une part, évaluer la flore aérobie sporulée mésophile totale des échantillons de poudres de lait infantile commercialisées en Algérie et la recherche et l'identification de la flore aérobie sporulées mésophile et thermophile par la technique MALDI-TOF MS.
- Rechercher les gènes de toxicité dans les isolats de la flore aérobie sporulée et procéder à une étude phylogénétique par le séquençage du gène *rpoB*.

Pour atteindre ces objectifs, nous avons organisé le manuscrit en trois parties : La première a été consacrée à une revue bibliographique sur les poudres de lait infantile et la contamination de ces produits notamment par les bactéries aérobies sporulées, en mettant l'accent sur le genre *Bacillus* et espèces pathogènes. La deuxième partie montre le matériel et les méthodes utilisés pour l'application des protocoles expérimentaux. Enfin, la troisième partie de ce travail sera consacrée aux résultats et à leur discussion en relation avec les travaux scientifiques antérieurs.



**Synthèse  
bibliographique**

## **I. Le lait infantile**

### **I. 1. Introduction**

La sécurité sanitaire des aliments est l'un des problèmes les plus importants de la santé publique dans le monde en particulier dans les pays en voie de développement. Ainsi, elle constitue une priorité absolue. Les problèmes liés à la sécurité sanitaire des aliments sont traités plus ou moins efficacement, grâce à la réglementation élaborée par les gouvernements nationaux et internationaux (Kent, 2015) et l'amélioration des services de santé, des soins et de la nutrition ce qui se reflète dans la baisse de la mortalité infantile (EFSA, 2014)

Les nourrissons sont définis comme des personnes âgées de moins de 12 mois (CAC, 2008), et la première année de vie d'un nouveau-né est la période la plus critique, en particulier du point de vue nutritionnel pour la croissance et le développement mental et physique (Arsalan *et al.*, 2013). Un nouveau-né est exposé à de nombreux facteurs qui peuvent avoir un impact négatif sur sa santé. Ainsi, la protection est très importante pendant la petite enfance. Pour cette raison, la meilleure source d'alimentation des bébés reste le lait maternel, qui est reconnu comme l'étalon d'or en nutrition infantile (Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019)

### **I. 2. Le lait maternel et ses bienfaits**

L'allaitement maternel représente le mode d'alimentation le plus adapté, il fournit toute la nutrition nécessaire à la croissance et au développement normal du nouveau-né (Victora *et al.*, 2016), sa composition, répond parfaitement aux besoins spécifiques du nourrisson et s'adapte dans le temps, et augmente aussi la relation affective entre le bébé et sa mère (Kent *et al.*, 2015). Cette source de vie joue un rôle déterminant en offrant au nourrisson tous les besoins pour une meilleure santé pendant le premier mois (Ahern *et al.*, 2019 ; WHO., 2003). Il est recommandé par les organisations de santé nationales et internationales au cours de la première année de vie (Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019). L'organisation mondiale de la santé recommande d'allaiter exclusivement au sein dans l'heure qui suit la naissance et pendant les six premiers mois de la vie et de compléter l'allaitement avec des aliments appropriés pour nourrissons jusqu'à 2 ans ou plus (WHO, 2003). Le lait maternel contient des composants immuno-régulateurs qui réduisent le risque d'infections gastro-intestinales et respiratoires (Kent *et al.*, 2015), il a un effet positif sur les fonctions

cognitives et immunitaires et minimise également le risque d'obésité et de maladies métaboliques plus tard dans la vie (Ahern *et al.*, 2019 ; Victora *et al.*, 2016). L'allaitement maternel exclusif au cours des 6 premiers mois de la vie protège l'enfant contre la morbidité et la mortalité liées aux maladies infectieuses et confère des avantages maternels, notamment une réduction du risque d'hémorragie post-partum, de cancer du sein invasif, de maladies cardiovasculaires, de cancer de l'ovaire, de diabète de type 2 et d'autres conditions chroniques associées au surpoids (Victora *et al.*, 2016). La composition du lait maternel diffère de celle des autres espèces de mammifères par la présence et le niveau de nombreux facteurs immunitaires, dont la lactoferrine, l'immunoglobuline A (IgA) et les oligosaccharides. De plus en plus, des preuves montrent que ces facteurs contribuent à améliorer la santé des nourrissons. (Bode, 2018 ; Witkowska-Zimny *et al.*, 2017).

### **I. 3. Substitut du lait maternel**

Compte tenu de l'évolution de la santé publique, de l'allaitement maternel et du lait maternel dans le développement humain et la santé tout au long de la vie, il existe des compromis relatifs lorsque les substituts du lait maternel sont utilisés (WHO, 2003). Pour ces raisons, les parents et les soignants recherchent des substituts de lait humain lorsque le propre lait de la maman n'est pas disponible ou nécessite une supplémentation en raison d'un facteur de maladie, d'un déséquilibre hormonal, ou quand la mère elle-même n'est pas intéressée par l'allaitement maternel, (Palmquist *et al.*, 2019 ; WHO, 2003) :

L'OMS et L'UNICEF recommandent les alternatives suivantes

- Allaitement par une autre femme allaitante en bonne santé,
- Obtention de lait auprès d'une banque de lait maternel.
- Obtention d'un substitut du lait maternel, comme les préparations pour nourrissons.

Si les deux premières options ne sont pas possibles, alors le recours aux préparations pour nourrissons est inévitable, ces préparations sont proposées comme un substitut efficace et formulés pour imiter le maximum possible la composition nutritionnelle du lait maternel (Ahern *et al.*, 2019; Green et Shurley, 2016 ; WHO, 2003).

### **I. 3.1. Historique**

Depuis longtemps, les mères qui ne pouvaient pas assurer l'allaitement de leurs nouveaux nés, les ont confiés à une nourrice à domicile pour les familles les plus aisées ou les ont envoyés chez des nourrices à la campagne pour les classes sociales moins favorisées. Moins fréquemment elles donnaient aux nourrissons des laits artificiels préparés par elles-mêmes, le plus souvent à base de lait de vache non stérile, ce qui provoquait la mort de nombreux bébés (Andrew, 2003). Avec le développement des traitements thermiques comme la pasteurisation, l'apparition du biberon muni d'une tétine en caoutchouc, le travail des femmes exerçant une activité de plus en plus en dehors du cadre familial et l'évolution des mentalités ont amené progressivement au cours du 19<sup>ème</sup> siècle à employer par préférence ces laits artificiels à base de lait d'origine animale, de farine de céréales et de sucre, mais elles étaient encore mal formulées, entraînant des infections gastro-intestinales et des déshydratations aiguës ou des toxicoses (Mary *et al.*, 1994).

Le substitut de lait maternel a été le résultat de l'imagination du professeur de chimie Justus Von Liebig pour deux de ses petits-enfants qui n'étaient pas allaités. Après avoir analysé la composition chimique du lait humain et du lait de vache, il crée en 1865 le premier lait artificiel pour enfant, mélange à partir de farine de blé, d'extrait de malt et de bicarbonate de potasse, devant être délayé dans de l'eau et du lait de vache écrémé. Dès 1866, Henri Nestlé conçoit une farine lactée sur le même principe que Justus Von Liebig et la commercialise en 1867 avec plus de succès que son prédécesseur (Berthold, 2010). Justus Von Liebig qualifié sa préparation de « nourriture parfaite pour nourrissons » en termes d'alimentation artificielle même s'il y avait peu de connaissances sur sa composition nutritive (Fomon, 1987). Par la suite, Otto Heubner et Max Rubner ont permis de mieux comprendre les besoins énergétiques des nourrissons quand ils ont développé la première méthode d'alimentation calorimétrique (Cone, 1976). Au début du 19<sup>ème</sup> siècle, le manque d'assainissement était répandu et les biberons étaient mal lavés constituant ainsi la principale cause de décès chez les nourrissons au cours de la première année de vie (Stevens *et al.* 2009).

À partir de 1970, on assiste au développement d'une industrie des préparations pour nourrissons et les préparations commerciales étaient utilisées plus fréquemment. La majorité des nourrissons ont commencé à recevoir de manière régulière des préparations à base de lactosérum au cours des six premiers mois de vie ou du lait de



vache jusqu'à un an (Martinez et Dodd, 1983). En 1980, la première norme du Codex Alimentarius pour les préparations pour nourrissons a été publiée (CAC, 1981). Pendant cette période, l'utilisation de préparations pour nourrissons continuait à augmenter (Martinez et Dodd, 1983).

A partir des années 1980, bien que les taux de consommation de préparations pour nourrissons sont restés élevés, les taux d'allaitement ont commencé à remonter (Fomon, 1987). Avec le temps, de mauvaises conséquences -liées aux préparations pour nourrissons- sur la santé commençaient à apparaître, tels que l'hypersensibilité, l'obésité et le diabète (Stevens *et al.*, 2009).

### **I. 3.2. Les trois grandes classes de lait infantile**

Les préparations de lait infantile peuvent être trouvées sur le marché sous deux formes différentes ; la forme liquide et la forme en poudre. Le lait infantile en poudre est une option moins chère et plus populaire par rapport à la forme liquide, en raison de la longue durée de conservation, et de la facilité de son stockage (McHugh *et al.*, 2017 ; Kent *et al.*, 2015).

Concernant les poudres de lait infantile (**PLI**), il est nécessaire de distinguer trois périodes d'âges. En effet, certaines fonctions digestives et organiques sont immatures à la naissance, d'où la nécessité d'une alimentation adaptée et évolutive de la naissance jusqu'à l'âge de 3 ans. Les poudres de lait infantile (PLI) sont ainsi divisées en trois catégories.

#### **I. 3.2.1. Poudre de lait infantile (1<sup>ère</sup> âge)**

On distingue les préparations pour nourrissons de premier âge (1<sup>er</sup> âge), spécialement destinées à la période de vie qui s'étale de la naissance jusqu'à l'âge de 6 mois. En effet, durant les six premiers mois de la vie, l'alimentation du nourrisson doit être exclusivement lactée. Les capacités rénales du nourrisson ne peuvent supporter de trop grandes quantités de protéines et d'électrolytes et son équipement enzymatique ne peut digérer de grandes quantités de l'amidon. (CAC, 2007)

#### **I. 3.2.2. Poudre de lait infantile (2<sup>ème</sup> âge)**

La Poudre de lait infantile (2<sup>ème</sup> âge), également appelée préparation de suite, est destinée pour des nourrissons âgés de six (6) à douze (12) mois. À cet âge, l'alimentation du nourrisson connaît une période de transition, avec la diversification, c'est-à-dire l'introduction progressive d'aliments autres que le lait. Ces préparations

de suite (ou de deuxième âge) ont une composition adaptée aux besoins nutritionnels d'un nourrisson de 6 mois à 12 mois. Elles ont pour objectif de pallier aux éventuelles carences liées à la diversification alimentaire, notamment en acides gras essentiels et en fer, et d'éviter certains excès de protéines. (Beylot, 2009)

### **I. 3.2.3. Poudre de lait infantile (3<sup>ème</sup> âge)**

Après un an, les nourrissons sont allaités par des PLI appelées également laits de croissance. Après 12 mois, les fonctions digestives, rénales et neurologiques sont suffisamment matures pour autoriser une alimentation d'adulte. L'enfant est toujours en phase de croissance relativement rapide, avec des besoins nutritionnels encore importants en protéines, calcium, fer et acides gras essentiels. Or, à cet âge, la diversification alimentaire s'accompagne bien souvent d'un apport excessif en protéines, d'un apport lipidique déséquilibré, trop riche en graisses animales et pauvre en acides gras essentiels, d'apports limités en calcium, voire totalement insuffisants en fer. Ainsi, l'utilisation d'un lait de croissance à la place de certains aliments au moment du petit déjeuner et du goûter apporte de nombreux avantages à la santé de l'enfant (Beylot, 2009).

### **I. 3.3. Statistiques relatives au marché des préparations pour nourrissons**

Plus de 140 millions d'enfants naissent dans le monde chaque année, les pays en développement représentent 92% des naissances, et 90% des enfants vivent dans les régions les moins développées comme l'Asie-Pacifique, l'Amérique latine Amérique, le Moyen-Orient et l'Afrique (Blanchard *et al.*, 2013).

L'Asie concentre 53% du marché mondial des préparations pour nourrissons. L'Europe et l'Amérique du Nord représentent 33%. Le marché mondial des préparations pour nourrissons a été évalué à 907 000 tonnes en 2007, passant à 1,13 Million de tonnes en 2010, représentant respectivement 9 et 11,5 milliards de dollars américains (UBIC Consulting, 2011) et atteint 18.9 milliards de dollars américains en 2014 (Blanchard *et al.*, 2013).

La production mondiale de préparations pour nourrissons a présenté une croissance moyenne de 8.2% par an entre 2007 et 2010, et est estimée à 11% en moyenne annuelle de 2010 à 2014, avec une croissance très rapide du marché chinois (Blanchard *et al.*, 2013). L'augmentation prévue des ventes mondiales de lait en poudre infantile de 2014 à 2018 était de 30.4% (Baker *et al.*, 2016). Cinq grandes

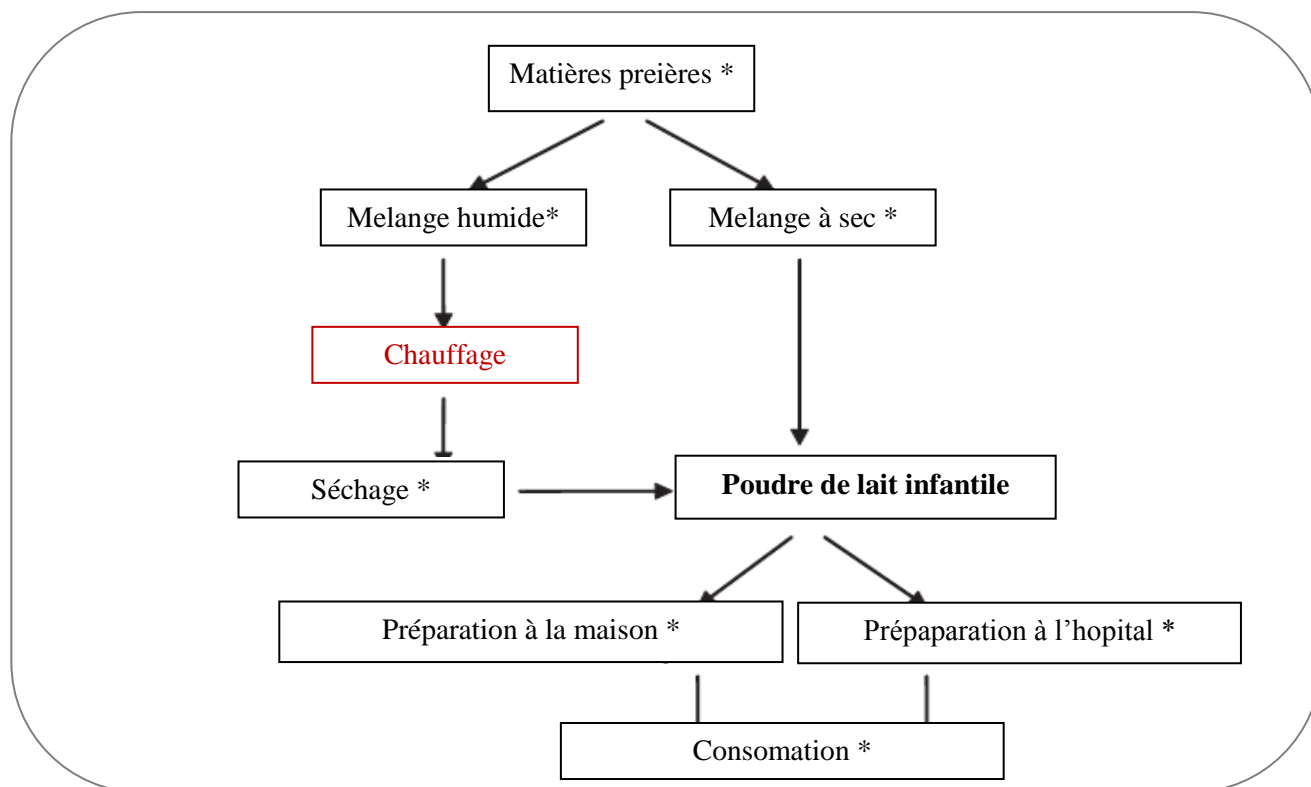
entreprises représentaient 70% de la valeur du marché mondial des fabricants de préparations pour nourrissons en 2006: Nestlé Nutrition, Mead Johnson, Abbott Nutrition, Danone et Wyeth Nutrition (maintenant Pfizer) par ordre décroissant (Montagne *et al.*, 2009). L'allaitement maternel ne doit pas être découragé par la promotion commerciale des préparations pour nourrissons, l'OMS a publié un code international de commercialisation des substituts du lait maternel en 1981 pour promouvoir l'allaitement maternel et restreindre la commercialisation des substituts du lait maternel, tels que les préparations pour nourrissons (WHO, 1981).

### **I. 3. 4. Fabrication des poudres de lait infantile**

La fabrication des PLI implique un certain nombre d'opérations unitaires comme le mélange des ingrédients, l'homogénéisation, le traitement thermique, le séchage et l'emballage (Forsythe, 2014). Les PLI peuvent être produites de trois manières différentes (Kent *et al.*, 2015) :

1. Procédé de mélange à sec.
2. Procédé de mélange humide.
3. Procédé combiné.

Quel que soit le procédé utilisé (Figure 1), la poudre résultante est emballée dans des conteneurs, rincée avec du gaz inerte, scellée avec un capuchon étanche, codée et étiquetée. Chaque lot de préparation est conservé jusqu'à ce que des échantillons de celui-ci aient été analysés pour l'uniformité, le contenu nutritionnel et la sécurité microbiologique (FAO et WHO, 2004).



**Figure 1** : Organigramme de production et d'utilisation des poudres pour nourrissons.

(FAO et WHO, 2004)

\* = sites potentiels de contamination environnementale.

### I. 3.4. 1. Procédé de mélange à sec

Dans ce procédé, les divers composants de la formule sont traités thermiquement et séparément par les fournisseurs, à l'usine de fabrication de la PLI, ils sont mixés ensemble pour assurer un mélange uniforme de nutriments dans toute la poudre (Kent *et al.*, 2015). Ce processus est plus efficace d'un point de vue énergétique et offre plus de flexibilité dans les modifications de la préparation (FAO et WHO, 2004). Le mélange à sec n'implique pas l'utilisation de l'eau dans le processus de fabrication, ce qui réduit le risque que des bactéries nocives se développent dans l'environnement de l'usine en nombre suffisant pour provoquer une contamination du produit (Fricker-Feer, 2012). Dans le processus de mélange à sec, il est essentiel que les ingrédients de base répondent aux mêmes normes microbiologiques que le produit final car ils ne reçoivent aucun traitement thermique supplémentaire. Si un ou plusieurs ingrédients d'un produit mélangé à sec sont contaminés par un nombre même faible de bactéries nocives, ces bactéries seront présentes dans le produit fini (Zink, 2003). Afin de garantir la conformité aux normes de qualité élevées requises par l'industrie, les

fabricants qui utilisent ces procédés entretiennent des relations étroites avec leurs fournisseurs de matières premières et exigent le strict respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF) et de l'analyse des risques, en appliquant les principes du système HACCP (FAO et WHO, 2004).

#### **I. 3.4.2. Procédé de mélange humide**

C'est un procédé qui permet de mélanger, d'homogénéiser et de traiter thermiquement tous les composants mélangés. En raison de l'intégration d'une étape de traitement thermique, la qualité microbiologique du produit fini dépend beaucoup moins des ingrédients de base (Kent *et al.*, 2015). Dans ce processus, les ingrédients sont manipulés en phase liquide et traités thermiquement puis séché (FAO et WHO, 2004). L'étape de pasteurisation qui est un point critique de contrôle (CCP) a comme objectif de détruire toutes les bactéries nocives qui peuvent être présentes dans les ingrédients (Zink, 2003). Après la pasteurisation, des micronutriments sensibles à la chaleur sont ajoutés. La qualité microbiologique de ces micronutriments est importante car d'autres traitements thermiques ultérieurement ne sont plus appliqués au produit (Proudy *et al.*, 2008).

Avant le séchage, le mélange liquide est pasteurisé 72 °C/15 s et 74.5°C/25 s pour les produits contenant des amidons ou des épaississants, ou à des températures plus élevées par exemple 105 -125 °C/5 s), homogénéisé, dans certains cas évaporé et parfois stocké dans de grandes cuves réfrigérées (FAO et WHO, 2004). Le mélange liquide est chauffé à environ 82° C puis pompé sous haute pression pour le pulvériser, un atomiseur est monté dans une grande chambre de séchage à travers laquelle circule de l'air filtré à haute température. La température de l'air admis varie de 135 à 204°C et la température de l'air à sa sortie de la tour est de 45 à 80°C. Le mélange liquide est séché presque instantanément et la poudre résultante tombe au fond du séchoir pour la collecte. La poudre passe ensuite de la chambre de séchage à un lit de refroidissement où elle est rapidement refroidie à une température inférieure à 38°C (FAO et WHO, 2004). Ce processus garantit également la distribution uniforme des nutriments dans chaque lot. La nature de ce processus nécessite que l'équipement de fabrication soit régulièrement nettoyé à l'eau. La présence de liquide dans l'environnement de fabrication due à ce nettoyage peut permettre la présence et la croissance de microorganismes (Kent *et al.*, 2015).

Les fabricants qui utilisent le procédé de mélange humide divisent généralement leurs espaces de travail dans l'usine en zones de processus humides et en zones de processus sèches, et limitent strictement les mouvements de personnes et d'équipements entre les deux zones. (Zink, 2003).

### **I. 3.4.3. Le procédé combiné**

Souvent, la fabrication des PLIs suit une procédure combinée lorsque des composants solubles dans l'eau sont ajoutés au lait avant le séchage et les composants moins solubles sont ajoutés au mélange après le séchage (Caric, 1993). Ce type de processus implique le séchage d'un mélange humide des principaux ingrédients de la formule (lipides, protéines et glucides), appelés poudre de base pour préparations pour nourrissons. Cette poudre de base est ensuite combinée avec des ingrédients mineurs pré-séchés (vitamines et minéraux) et mélangée pour produire le produit fini (Kent *et al.*, 2015). Le procédé combiné est parfois l'unique option pour certaines PLIs, en particulier pour les formules épaississantes qui ne nécessitent l'ajout d'ingrédients mélangés à sec qu'après l'étape de traitement thermique, en effet, les épaississants ne peuvent pas être traités thermiquement sous forme liquide en raison de leur viscosité élevée (Proudy *et al.*, 2008)

## **II. Contamination microbienne des poudres de lait infantiles (PLI)**

### **II. 1. Qualité bactériologique et contaminants bactériens des PLIs**

Les PLIs contiennent des microorganismes de différents types et en différentes quantités (Costa *et al.*, 2020; Chitrakar *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2018 ; Forsythe, 2005). Les PLIs sont également considérées comme un aliment à haut risque en raison de leur richesse en ingrédients nutritionnels et de leurs consommateurs vulnérables (Yong Yang *et al.*, 2017). Une grande attention a été accordée à la sécurité des PLIs dans le monde, en particulier après la fraude de la mélamine en Chine (Newell *et al.*, 2010). Des normes d'hygiène élevées sont maintenues tout au long du processus de production et la qualité microbiologique de chaque lot est étroitement surveillée; cependant, les PLIs ne sont pas des produits stériles même si elles ont été fabriquées selon des normes d'hygiène strictes (WHO et FAO, 2007). En raison de la sensibilité des nouveau-nés aux infections bactériennes, les PLIs doivent satisfaire à des critères microbiologiques nationaux et internationaux très sévères (Ramgopal *et al.*, 2019; Cho *et al.*, 2019 ;Cortese *et al.*, 2016 ; CAC, 2008). Les nouveau-nés sont

particulièrement vulnérables à l'infection en raison de leurs organes internes immatures et de l'absence, chez eux, d'un système immunitaire développé (Vidic *et al.*, 2020; Ahern *et al.*, 2019; Pajewska-Szmyt *et al.*, 2019 ; Townsend et Forsythe, 2008). De plus, la flore commensale qui peut agir comme barrière à l'infection dans le tube digestif n'est pas encore établie à ce stade précoce de la vie (Chap *et al.*, 2009).

Bien qu'avec les traitements thermiques déployés dans la fabrication des PLI, on peut avoir jusqu'à 10 réductions décimales pour les micro-organismes végétatifs, y compris *Salmonella*, *Cronobacter sakazakii* et d'autres *Enterobacteriaceae* (WHO et FAO, 2008). Cela ne permet pas d'avoir des produits stériles. La contamination des PLIs peut être une source de microorganismes pathogènes dangereux pour les nourrissons (Costa *et al.*, 2020; ;Chitrakar *et al.*, 2019 ; Cho *et al.*, 2019 ; Ramgopal *et al.*, 2019 ; Wu *et al.*, 2018 ; Yong Yang *et al.*, 2017; Cortese *et al.*, 2016; CAC, 2008; Forsythe, 2005). Par ailleurs, la présence des microorganismes dans les PLIs sert d'indicateur du niveau d'hygiène du process pendant la production (Vidic *et al.*, 2020 ; Zhao *et al.*, 2020; Zhuang *et al.*, 2019 ; Pei *et al.*, 2018; Chap *et al.*, 2009). En raison de la faible activité d'eau ( $A_w$ ) des PLIs, les micro-organismes qui y sont présents ne peuvent pas se développer mais le risque de multiplication reste probable après la reconstitution de la poudre.

## **II. 2. Sources de contamination bactérienne des PLIs**

La contamination des PLIs peut provenir de sources intrinsèques ou extrinsèques (Pei *et al.*, 2019 ; Zhuang *et al.*, 2019 ; Cho *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2014 ; Buchanan et Oni, 2012 ; Becker *et al.*, 1994).

Les sources intrinsèques comprennent les matières premières et les ingrédients. En effet, la qualité et l'innocuité du produit fini dépendent fortement de la qualité initiale du lait cru utilisé car la charge bactérienne augmentera très probablement pendant la transformation (Gopal *et al.*, 2015).

La source extrinsèque principale reste l'environnement dans lequel la PLI est fabriquée ou préparée à la consommation (Lu *et al.*, 2019 ; Proudy *et al.*, 2008 ; WHO et FAO, 2008). La contamination peut se produire pendant une mauvaise manipulation par la maman, un nettoyage inadéquat des biberons, un réchauffage multiple ou des procédures de réhydratation inappropriées, également la manipulation et la préparation de PLI au niveau des unités de soins intensifs, disposant

généralement comme réservoir microbien l'environnement ou le personnel soignant (Masood *et al.*, 2015 ; Van Acker *et al.*, 2001 ; Simmons *et al.*, 1989).

L'hygiène du personnel et les mauvaises pratiques d'hygiène ont souvent été à l'origine d'épidémies (Arsalan *et al.*, 2013). Une contamination microbienne peut se produire pendant le processus de fabrication et / ou pendant la reconstitution post-fabrication de la PLI, pour cette raison en 2007, les directives FAO / WOH ont suggérés un code international de pratiques hygiéniques pour les aliments pour nourrissons et enfants. La PLI doit être reconstituée à 70 °C, pour l'inactivation de la croissance bactérienne (WHO et FAO, 2007).

En ce qui concerne les spores, celles-ci peuvent contaminer les poudres de lait à travers leurs pénétration dans le lait cru via les tétines, outillage et ustensiles de la traite et les cuves et tanks (Oliveira *et al.*, 2016 ; CAC, 2008). Les spores peuvent provenir du sol (Heyndrickx, 2011 ; Coorevits *et al.*, 2008), des matières fécales, de la litière, des aliments pour animaux ou des équipements de traite (Oliveira *et al.*, 2016 ; Lücking *et al.*, 2013 ; Kramer et Gilbert, 1989).

De plus, la contamination peut se produire pendant le transport de la ferme à l'usine de transformation (Vidic *et al.*, 2020 ; Oliveira *et al.*, 2016), ainsi qu'au sein de l'usine de transformation elle-même (Burgess *et al.*, 2010 ; Coorevits *et al.*, 2008). La formation de biofilms en surface des équipements représentent une préoccupation majeure pour le secteur de la transformation de lait (Chitrakar *et al.*, 2019 ; McHugh *et al.*, 2017 ; Peña *et al.*, 2014). Les biofilms, résistants au nettoyage, peuvent servir comme réservoir de spores bactériennes qui peuvent ensuite se dissiper et contaminer la poudre de lait en permanence (Pereira et Sant'Ana., 2018 ; McHugh *et al.*, 2017 ; Scott *et al.*, 2007).

Les bactéries associées à la contamination de la PLI, en particulier les *Enterobacteriaceae*, ont été isolés de l'air ambiant des ateliers de fabrication (Wu *et al.*, 2018 ; Jacobs *et al.*, 2011). Des études ont montré que les bactéries pathogènes en suspension dans l'ambiance de fabrication pourraient contaminer le produit fini et provoquer de graves infections néonatales. Ces études ont signalé la présence du *Cronobacter* spp. dans les poussières en suspension dans l'air collecté par les filtres à air de lignes de production. Ainsi, les bactéries en suspension dans l'air sont considérées comme une source potentielle de contamination des PLI et peuvent



entraîner des problèmes de qualité et de sécurité du produit fini (Wu *et al.*, 2018 ; Jacobs *et al.*, 2011 ; Proudly *et al.*, 2008).

Brandl *et al* (2014) ont étudié la distribution de microorganismes dans l'air d'une usine suisse de transformation de lait en utilisant la méthode traditionnelle basée sur la culture. Quatre-vingt-quatorze (94) types de colonies morphologiquement différentes ont été identifiés à partir de l'air de différents sites d'échantillonnage. Ces isolats comprenaient des agents pathogènes opportunistes, tels que : *Roseomonas mucosa*, *Bacillus cereus*, *Brevundimonas diminuta*, *Moraxella osloensis*, *Macrococcus caseolyticus*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus saprophyticus*. La plupart des agents pathogènes opportunistes ont été isolés au niveau du remplissage (Wu *et al.*, 2018).

## **II. 3. Bactéries pathogènes isolées des PLIs**

Dans les études citées prédominamment, la majorité des micro-organismes en suspension dans l'air ont été non cultivables. En effet, seuls 10% de micro-organismes peuvent être détectés par des méthodes basées sur la culture (Horner-Devine *et al.*, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004). Pour surmonter cette lacune, la technologie de séquençage peut être utilisée pour fournir des informations plus détaillées concernant les structures des communautés microbiennes associées aux PLIs. De plus, la composition de la communauté microbienne de l'air d'une usine de PLI est supposée être très diversifiée (Wu *et al.*, 2018). Un groupe de consultation mixte FAO/WHO (2004-2006) a identifié les principaux micro-organismes associés à la contamination des PLIs et qui sont : *Cronobacter* spp. , *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter agglomerans*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*. Ils ont mis l'accent sur *Staphylococcus* spp. *Cronobacter* spp. et *Salmonella enterica* qui ont été identifiés comme les agents pathogènes les plus préoccupants (Kent *et al.*, 2015). En 2004, le groupe d'experts scientifiques sur les dangers biologiques (groupe Biohaz) faisant partie de l'Autorité européenne de sécurité sanitaire des aliments (EFSA) ont exprimé un avis sur les risques microbiologiques liés aux préparations pour nourrissons, concluant que les bactéries *Salmonella* et *E. sakazakii* étaient les microorganismes les plus inquiétants (EFSA, 2004).

**II. 3.1. Bactéries pathogènes non sporulées isolées des PLIs**

**II. 3.1.1. *Cronobacter* spp.**

*Cronobacter* spp., en particulier *Cronobacter sakazakii*, ont été associés à plusieurs foyers et cas sporadiques de maladies impliquant des nouveau-nés (Masood *et al.*, 2015 ; Iversen et Forsythe, 2004). En 2006, l'OMS a déclaré qu'il a été prouvé de façon convaincante, tant sur le plan épidémiologique que microbiologique que les PLIs contaminées par *Cronobacter* spp. constituaient un véhicule et une source d'infection chez les nourrissons (WHO et FAO, 2006). Le tableau N°1 résume les cas constatés et les investigations menées sur ce pathogène dans les LPIs. *Cronobacter sakazakii* est considéré comme un contaminant pathogène émergent des PLIs. Il provoque une forme potentiellement mortelle de méningite néonatale, de bactériémie, d'entérococolite nécrosante et de méningo-encéphalite nécrosante chez les nourrissons sains, prématurés et immunodéprimés (Masood *et al.*, 2015 ; WHO et FAO, 2008; Van Acker *et al.*, 2001 ; Simmons *et al.*, 1989)

**Tableau 1 :** Incidence de *Cronobacter* spp. et *Cronobacter sakazakii* dans les PLIs

<b>Microorganisme</b>	<b>Pays</b>	<b>Aliment</b>	<b>Référence</b>
<i>C. sakazakii</i>	Pays-Bas	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>C. sakazakii</i>	États Unis	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>C. sakazakii</i>	Inde	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>C. sakazakii</i>	Japon	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>C. sakazakii</i>	France	PLI	(Masood <i>et al.</i> , 2015)
<i>Cronobacter</i> spp.	Islande	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>Cronobacter</i> spp.	États Unis	PLI	(Simmons <i>et al.</i> , 1989)
<i>Cronobacter</i> spp.	France	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>Cronobacter</i> spp.	Belgique	PLI	(Van Acker <i>et al.</i> , 2001)
<i>Cronobacter</i> spp.	Nouvelle-Zélande	PLI	(WHO et FAO, 2008)
<i>Cronobacter</i> spp.	Jordanie	PLI	(Chap <i>et al.</i> , 2009)
<i>Cronobacter</i> spp.	Chine	PLI	(Lu <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cronobacter</i> spp.	Chine	PLI	(Pei <i>et al.</i> , 2019)
<i>Cronobacter</i> spp.	Allemagne	PLI	(Fricker-Feer , 2012)

## II. 3.1.2. *Salmonella* spp.

Les *Salmonelles* ont été à l'origine d'infections et de maladies graves chez les nourrissons pouvant entraîner d'importantes séquelles de développement et par fois même la mort (Gurtler et Beuchat, 2007 ; WHO et FAO, 2006). L'incidence de la salmonellose chez les nourrissons est plus élevée que dans tous les autres groupes d'âge. Six foyers d'infection à *Salmonella* associés aux PLIs au cours de la période 1985-2005, impliquant environ 290 nourrissons, indiquent clairement que la contamination de la PLI par des espèces de *Salmonella* (Cahill *et al.*, 2008). Le tableau N°2 résume les incidents d'épidémies et les investigations de *Salmonella* spp. dans la PLI.

**Tableau 2** : Incidence de sérovars de *Salmonella* inféodés à la PLI et impliqués dans des cas d'infections dans certains pays (Cahill *et al.*, 2008).

Sérovars de <i>Salmonella</i>	Pays	Nomre de cas
<i>ealing</i>	Royaume-Uni	48
<i>tennessee</i>	États Unis, Canada	≥ 3
<i>virchow</i>	Espagne	≥ 48
<i>anatum</i>	Royaume-Uni, France	17
<i>london</i>	République de Corée	30
<i>agona</i>	France	141

## II. 3.1.2. 3. Autres bactéries pathogènes

D'autres bactéries sont susceptibles de contaminer la PLI et de provoquer des infections graves (diarrhées, entérocolites nécrosantes, méningites ou septicémies), parfois sous forme épidémique dans les services de pédiatrie, le tableau N°3 synthétise quelques données relatives à des épisodes infectieux dus à des bactéries non sporulées inféodées aux PLIs.

**Tableau 3** : Incidence de bactéries pathogènes inféodées aux PLIs dans quelques pays

Pays	Organismes	Références
<b>Brésil</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Chap <i>et al.</i> , 2009
	<i>Enterobacteriaceae</i>	
	<i>Pantoea</i> spp.	
<b>Royaume-Uni</b>	<i>Citrobacter freundii</i>	Iversen et Forsythe, 2004
	<i>Klebsiella ozaenae</i>	
	<i>Pantoea</i> spp.	
	<i>Rahnella aquatilis</i>	
	<i>Serratia ficaria</i>	
	<i>Clostridium botulinum</i>	Brett <i>et al.</i> , 2005

<b>Chine</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2012
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2011
	<i>Aeribacillus pallidus</i>	
	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	
	<i>Brevibacillus brevis</i>	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
	<i>Lysinibacillus phaericus</i>	
	<i>Paenibacillus macerans</i>	
<b>Égypte</b>	<i>Virgibacillus proomii</i>	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	
<b>Égypte</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	El-Gamal <i>et al.</i> , 2013
<b>Pakistan</b>	<i>Bacillus cereus</i>	Arsalan <i>et al.</i> , 2013

## II. 3. 2. Bactéries sporulées pathogènes

Les bactéries sporulées qui en fonction de leur température optimale de croissance, peuvent être classées comme thermophiles, mésophiles ou psychrotolérantes, représentent un souci majeur pour les transformateurs du lait en poudre. Les bactéries sporulées thermophiles sont les plus répandues dans les produits laitiers secs (Gopal *et al.*, 2015).

Comprendre les facteurs qui conduisent à la prolifération et à la survie des bactéries sporulées dans les usines de production de la PLI est indispensable pour contrôler et réduire leurs présence (Watterson *et al.*, 2014). En effet, contrairement aux cellules végétatives, les spores bactériennes peuvent survivre aux traitements thermiques utilisés dans les process de fabrication (Zhuang *et al.*, 2019; Alvarenga *et al.*, 2018; McHugh *et al.*, 2017 ; Watterson *et al.*, 2014). Cependant, la littérature se concentre principalement sur *Cronobacter sakazakii*. Les bactéries sporulées, en particulier, *Bacillus* spp. sont faiblement signalées dans les PLIs (McHugh *et al.*, 2017 ; Gopal *et al.*, 2015 ; Hwang et Park., 2015 ; Becker *et al.*, 1994 ).

Les principales bactéries sporulées isolées des PLIs sont identifiées comme des espèces de la classe des *Bacilli*, dont beaucoup sont capables de former des endospores (Checinska *et al.*, 2015 ; Watterson *et al.*, 2014), parmi lesquelles on distingue les genres *Bacillus*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus*, *Lysinibacillus*, *Brevibacillus* et *Paenibacillus*. Ces bactéries ont en commun la possibilité de former une endospore résistante au stress (McHugh *et al.*, 2017). Une fois les poudres de lait réhydratées, les spores peuvent germer avec l'activation des récepteurs de germination, soit en réponse à des nutriments appelés germinants ou par activation thermique (McHugh *et al.*, 2017 ; Gopal *et al.*, 2015 ; Hwang et Park.,

2015 ; Watterson *et al.*, 2014; Becker *et al.*, 1994). Si le milieu devient favorable, les bactéries sporulées peuvent germer et proliférer, en provoquant une détérioration de l'aliment ou une intoxication alimentaire (Özdemir et Arslan, 2019; Pia *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2016; Hwang et Park., 2015; Checinska *et al.*, 2015; De Jonghe *et al.*, 2010), et surtout en l'absence de la concurrence des bactéries non sporulantes qui sont généralement éliminées lors des traitements thermiques partiqués dans les process (Yang *et al.*, 2017 ; Kent *et al.*, 2015 ; WHO et FAO, 2004).

Parmi les bactéries sporulées identifiées dans les poudres de lait, on distingue des représentants spécifiques de *Clostridium* spp. et de *Bacillus* spp. qui sont les plus préoccupants du point de vue de la sécurité sanitaire en raison de leur résistance au stress environnemental (McHugh *et al.*, 2017). Les bactéries sporulées qui contaminent les produits laitiers peuvent également différer en raison de la préférence des conditions anaérobies ou aérobies (Gopal *et al.*, 2015) et il convient de noter que dans le cas des poudres de lait, les bactéries anaérobies sporulées, comme les *Clostridium* spp. sont moins fréquentes que les bactéries sporulées aérobies, cela peut être dû au degré élevé d'aération impliqué dans le traitement des poudres lait (McHugh *et al.*, 2017).

Généralement, les PLIs sont connues pour être principalement contaminées par des bactéries sporulées aérobies du genre *Bacillus* (Hwang et Park, 2015 ; Di Pinto *et al.*, 2013 ; Haughton *et al.*, 2010 ; Rowan *et al.*, 1997 ; Becker *et al.*, 1994). Le tableau N°4 résume l'incidence des *Bacillus* spp. dans les PLIs.

**Tableau 4** : Incidence des *Bacillus* spp. dans la PLI

Microorganismes	Pays	Echantillons testés	Echantillons positifs	Références
<i>Bacillus cereus</i>	17 pays	261	54%	Becker <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus cereus</i>	Chili	94	39%	Reyes <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacillus</i> spp.	Chine	12	100%	Sadiq <i>et al.</i> , 2016
<i>Bacillus cereus</i>	Chine	/	/	Zhuang <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus cereus</i>	Chine	6656	7.53%	Pei <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus cereus</i>	Corée du	99	/	Hwang et Park., 2015
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Sud			

<i>Bacillus cereus</i>	Ecosse	100	17%	Rowan <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus cereus</i>	Egypte	45	100%	Sadek <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus cereus</i>	Irlande	100	24%	Haughton <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus spp.</i>	Italie	60	18%	Di Pinto <i>et al.</i> , 2013

### III. La flore aérobie sporulée inféodée aux PLIs

#### III. 1. Le Genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* englobe des bactéries ubiquitaires à Gram positif, sporulées, aérobie-anaérobies facultatives en forme de bâtonnets très répandues dans l'environnement car leurs besoins nutritionnels sont très basiques (Özdemir et Arslan, 2019). Ce genre est connu pour son extrême diversité phénotypique et son hétérogénéité (Özdemir et Arslan, 2019; Peña *et al.*, 2014 ; Heyndrickx, 2011; From *et al.*, 2005). Suite au développement des techniques de biologie moléculaire, ce genre a subi une reclassification considérable (Maughan et Van der Auwera, 2011). Les bactéries du genre *Bacillus* ont la capacité de produire une multitude d'enzymes, d'antibiotiques et de métabolites qui sont utilisées également dans de nombreux processus médicaux, pharmaceutiques, agricoles et industriel. (Celandroni *et al.*, 2019), cependant, elles peuvent aussi produire plusieurs types de toxines, d'hémolysines et de DNases, qui sont d'importants déterminants pathogènes (Sadiq *et al.*, 2018 ; Ouoba *et al.*, 2008; Farrar et Reboli, 2006 ; Rowan *et al.*, 2001).

Les endospores des *Bacillus* résistent aux conditions environnementales difficiles ainsi qu'aux procédures de désinfection (Özdemir et Arslan, 2019). Les caractères adhésifs de certaines spores peuvent aider à leur fixation sur les équipements du process constituant un point de contamination permanent (Checinska *et al.*, 2015; Burgess *et al.*, 2010). Les bactéries sporulées du genre *Bacillus* constituent la majorité de la flore aérobie sporulée dans le lait cru (Coorevits *et al.*, 2008).

Parmi les espèces de *Bacillus*, on distingue : *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* et *Bacillus thuringiensis* qui sont des agents pathogènes opportunistes courants chez l'Homme et l'animal (Farrar et Reboli, 2006). *Bacillus cereus* et d'autres espèces, notamment *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus pumilus*, ont également été impliquées dans des intoxications alimentaires et d'autres infections

chez l'Homme (Ozdemir et Arslan 2019; Logan, 2012 ; Ouoba *et al.*, 2008; De Jonghe *et al.*, 2010; From *et al.*, 2005 ; Rowan *et al.*, 2001).

Les *Bacillus* spp. produisent plusieurs enzymes a savoir ; phospholipase C spécifique de la phosphatidylcholine (lécithinase) et du phosphatidylinositol, de l'amylase, de la protéase, de la sphingomyélinase, de la collagénase, de la gélatinase et de la lipase, provoquent la détérioration des aliments et dégradant ainsi leurs qualité organoleptique (Sadiq *et al.*, 2018 ; Sadiq *et al.*, 2016; Hwang et Park, 2015 ; Lücking *et al.*, 2013 ; De Jonghe *et al.*, 2010).

L'omniprésence des espèces de *Bacillus* en abondance dans l'environnement augmente la probabilité de la contamination du lait en commençant de la traite jusqu'au produit final, et il est rarement possible de déterminer exactement la véritable source de contamination par *Bacillus* dans les produits laitiers où leur présence est inévitable, probablement, il s'agit d'un processus cumulatif (Oliveira *et al.*, 2016 ; CAC, 2008) au cours de la collecte du lait cru, de son transport, de son stockage et de sa transformation. De plus, la formation de spores leur permet de survivre à la pasteurisation (Zhuang *et al.*, 2019; Alvarenga *et al.*, 2018; Cho *et al.*, 2018; McHugh *et al.*, 2017 ; Becker *et al.*, 1994 ; Vidic *et al.*, 2020 ; Oliveira *et al.*, 2016). Néanmoins, les sources de contamination les plus couramment citées comprennent le sol (Heyndrickx, 2011 ; Coorevits *et al.*, 2008), la litière, l'ensilage, les matières fécales, l'eau de rinçage de l'équipement de traite et les aliments. (Oliveira *et al.*, 2016 ; Lücking *et al.*, 2013; CAC, 2008 ; Kramer et Gilbert, 1989). Une fois le lait cru contaminé par ces espèces d'altération, l'ensemble de la ligne de transformation du lait est affecté puisque certains *Bacillus* spp. produisent des spores hautement hydrophobes qui peuvent adhérer fermement aux matériaux inertes utilisés dans la transformation pour former des structures multicellulaires appelées biofilms (Gopal *et al.*, 2015). Une fois attachés aux équipement de fabrication, ces biofilms deviennent un réservoir de spores, qui agissent comme la principale source de contamination du produit laitier final, indiquant une mauvaise hygiène (Checinska *et al.*, 2015; Burgess *et al.*, 2010).

Parmi les espèces de *Bacillus*, les souches psychrotolérantes de *B. cereus* sont les souches prédominantes dans le lait cru (Scheldeman *et al.*, 2006). *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *B. subtilis* représentent les principales espèces sporulées mésophiles (Logan, 2012; De Jonghe *et al.*, 2010; From *et al.*, 2005) tandis que les souches



thermotolérantes de *B. licheniformis* sont les espèces plus thermophiles ou thermotolérantes répandues (Sadiq *et al.*, 2016 ; Watterson *et al.*, 2014 ; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997 ; Burgess *et al.*, 2010).

### **III. 1.1. Groupe *Bacillus cereus***

Le groupe *Bacillus cereus*, également connu sous le nom de *B. cereus* sensu lato, est une subdivision du genre *Bacillus* qui se compose de huit espèces officiellement reconnues: *B.cereus sensu stricto*, *B.anthraxis*, *B.thuringiensis*, *B.weihenstephanensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* (EFSA, 2016 ; Dréan *et al.* , 2015).

*B. cereus sensu stricto* est largement ubiquitaire dans le sol, la poussière, l'air et l'eau et résiste aux facteurs destructeurs de l'environnement (Zhuang *et al.*, 2019 ; Wu *et al.*, 2018 ; Alvarenga *et al.*, 2018; McHugh *et al.*, 2017; Heyndrickx, 2011). *B. cereus* est considéré comme un contaminant naturel et majeur des produits laitiers, et un important pathogène opportuniste communément associé aux maladies gastro-intestinales d'origine alimentaires (Peiet *al.*, 2018 ; Hwang et Park, 2015 ; Veysseyre *et al.*, 2015; Heyndrickx, 2011 ; Farrar et Reboli, 2006 ; Hilliard *et al.*, 2003). Il a été suggéré qu'il pourrait être utilisé comme indicateur de sécurité microbiologique approprié dans le cas des PLIs (Zhao *et al.*, 2020; Vidic *et al.*, 2020 ; Zhuang *et al.*, 2019 ; Yang *et al.*, 2017 ; Peña *et al.*, 2014; Scott *et al.*, 2007; Kramer et Gilbert, 1989).

Habituellement, la PLI est contaminée par *B. cereus* via le lait cru (Oliveira *et al.*, 2016 ; Arsalan *et al.*, 2013; De Jonghe *et al.*, 2010 ;Coorevits *et al.*, 2008 ; CAC, 2008 ). *B. cereus* représente un haut risque pour les nouveau-nés. Il est impliqué dans deux types d'intoxications alimentaires :

- 1) Syndrome diarrhéique, où l'entérotoxine responsable est produite par les cellules végétatives dans l'intestin grêle après la germination des spores bactériennes, et;
- 2) Syndrome émétique qui est vraisemblablement la conséquence d'une intoxication par la cereulide, précédemment formée dans les aliments par *B. cereus*. (Zhao *et al.*, 2020 ; Sadek *et al.*, 2018 ; EFSA, 2016 ; Hwang et Park, 2015 ; Di Pinto *et al.*, 2013 ; Guinebretière *et al.*, 2002)

La virulence de *B. cereus* a été attribuée à divers facteurs extracellulaires (Zhuang *et al.*, 2019 ; Hwang et Park, 2015 ; Minnaard *et al.*, 2007), l'hémolysine BL (HBL) (Beecher et Lee Wong, 2000) et l'entérotoxine non hémolytique (NHE) (Lund



et Granum, 1997). Il existe également d'autres facteurs qui sont des produits monogéniques codés par entFM (entérotoxine FM), bceT (entérotoxine *B. cereus*) et cytK (cytolysine K) (Fagerlund *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2000).

### **III. 1. 2. Groupe *Bacillus subtilis***

Le groupe *B. subtilis* est étroitement apparenté au groupe *B. cereus* et ne s'en distingue pas facilement (Ogier *et al.*, 2019 ; Adékambi *et al.*, 2008; Case *et al.*, 2007; Durak *et al.*, 2006). Les cellules de ces organismes mesurent moins de 1 µm de large, les sporanges ne sont pas gonflés et les spores sont ellipsoïdales. En général, les souches du groupe *B. subtilis* sont mésophiles et neutrophiles, en ce qui concerne le pH mais sont souvent tolérants à des niveaux de pH plus élevés.

Le groupe *B. subtilis* comprend : *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. subtilis* subsp. *spizizenii*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. clausii*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. firmus*, *B. lentus* et *B. sporothermodurans* (PHE et NHS, 2018). Le degré de similitude entre *Bacillus subtilis* et ses espèces étroitement apparentées est  $\geq 99\%$  pour le niveau de séquence d'ARNr 16S (Jeyaram *et al.*, 2011).

### **III. 1. 3. *Bacillus licheniformis***

*Bacillus licheniformis* est l'une des espèces de *Bacillus* les plus répandues et les plus rencontrées dans le lait cru et dans les chaînes de transformation laitière (Watterson *et al.*, 2014; Ivy *et al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2012 ;Haughton *et al.*, 2010; Rückert *et al.*, 2004 ; Rowan *et al.*, 1997). Bien que *B. licheniformis* ne soit pas classé comme pathogène humain, cette bactérie est connue pour sa détérioration du lait et les produits laitiers, et pose des problèmes de conformité aux spécifications et provoque des effets néfastes sur les propriétés organoleptiques et fonctionnelles du lait par la production des enzymes de détérioration (Sadiq *et al.*, 2016 ; Lücking *et al.*, 2013; De Jonghe *et al.*, 2010). La majorité des souches de *B. licheniformis* mais certaines sont considérées comme des thermophiles ou tout au moins thermotolérantes.

Ce type de souches est très répandu dans l'environnement de la production laitière. En effet, *Bacillus licheniformis* est le deuxième sporulé thermophile le plus détecté dans une enquête sur 28 échantillons de lait en poudre provenant de 18 pays différents, avec une occurrence totale de 39,2% (Sadiq *et al.*, 2016; Watterson *et al.*, 2014 ; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997; Rückert *et al.*, 2004). Des études

sur les effets saisonniers de la flore bactérienne des exploitations agricoles du Midwest américain (lait en vrac, environnement et ensilage de maïs) ont identifié que *B. licheniformis* était l'espèce prédominante en été (49,4%) ainsi qu'en hiver (62%) (Buehner *et al.*, 2015). Conformément à d'autres études, les préparations pour nourrissons et les poudres de lait entier échantillonnées auprès de divers fabricants en Chine ont identifié *B. licheniformis* comme le bacille thermophile le plus répandu dans les poudres de lait chinois, avec une présence de 36,8% sur 801 isolats (Yuan *et al.*, 2012). La forte prévalence de *B. licheniformis* dans les échantillons de lait est potentiellement attribuée à sa large distribution dans l'environnement et dans les exploitations laitières, par exemple, les concentrés d'aliments pour animaux, les matières fécales, les mamelles et les trayons souillés, le lait cru ainsi que la contamination d'origine industrielle (Oliveira *et al.*, 2016 ; Lücking *et al.*, 2013; CAC, 2008 ; Kramer et Gilbert, 1989 ; Rückert *et al.*, 2004)

### **III. 2. Toxicité de *Bacillus* spp. autres que *Bacillus cereus***

Il est largement connu que *B. cereus* est généralement l'espèce qui présente un problème de santé publique, en termes de maladies d'origine alimentaire. Cependant, quelques autres espèces de *Bacillus* spp. sont aussi capables de provoquer des maladies d'origine alimentaire (EFSA, 2016 ; Logan, 2012 ; From *et al.*, 2007 ; Kramer et Gilbert, 1989). Les membres de ce genre sont considérés comme non pathogènes à l'exception de *B. anthracis* et *B. cereus* (Gopal *et al.*, 2015). Il existe peu d'informations dans la littérature sur la pathogénie des *Bacillus* spp. autres que *B. cereus* (EFSA, 2016). Les infections à *Bacillus* spp. sont majoritairement associées à l'ingestion d'une importante quantité de cellules de la bactérie ou des toxines qu'elle peut produire (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008). Par exemple, les pathologies d'origine alimentaire provoquées par *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, ont toujours été associées à une population dans les aliments responsables, de l'ordre de  $10^5$  cellules ou spores par gramme (Kramer et Gilbert, 1989).

*Bacillus* spp. a été indiqué comme agent causal de deux épidémies de preuves solides signalées en 2009 et 2012 comme étant associées à la consommation de légumes et jus de fruits et autres produits dérivés ainsi que d'autres aliments (EFSA, 2016). Il a été signalé que d'autres espèces de *Bacillus* telles que *B. pumilus* et *B. subtilis*, souvent isolées du lait et de la ferme, produisent soit de la céréulide putative, la toxine émétique produite par *B. cereus* ou d'autres substances entérotoxiques qui

peuvent être nocives pour l'homme (Nieminen *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2014). *B. subtilis*, d'autre part, bien qu'il ne soit pas traditionnellement classé comme un agent pathogène humain, mais il a été impliqué dans des cas d'intoxication alimentaire, par exemple lors d'une épidémie de 2005 dans un jardin d'enfants causée par du lait en poudre, les vomissements étant le symptôme le plus courant, mais s'accompagne souvent de diarrhée (Pavic *et al.*, 2005; Logan, 2012). D'autres espèces de *Bacillus* telles que *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, ont été rapportés comme productrices d'entérotoxines et des toxines émétiques impliquées dans les maladies d'origine alimentaire (Rowan *et al.*, 2003; From *et al.*, 2005; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999; From *et al.*, 2007). D'après From *et al.* (2007), ils ont identifié une toxine, la pumilacidine, produite par *B. pumilus*, comme la cause probable d'une épidémie d'intoxication alimentaire avec des symptômes aigus se développant pendant les repas, suivie quelques heures plus tard par des crampes d'estomac et des diarrhées de plusieurs jours. Une analyse approfondie sur le genre *Bacillus*, réalisée par De Jonghe *et al.* (2010), a démontré que les tests cellulaires ont confirmé la production et fonctionnalité des toxines thermolabiles par *Bacillus circulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis*. Ainsi que pour *Bacillus licheniformis* (Beattie et Williams, 1999; Lindsay *et al.*, 2000), *Bacillus pumilus* (Lindsay *et al.*, 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* (Phelps et McKillip, 2002), *Bacillus mojavensis* (From *et al.*, 2007), *Bacillus simplex*, *Bacillus firmus*, *Bacillus megaterium* (Taylor *et al.*, 2005) et *Bacillus circulans* et *Bacillus lentus* (Beattie et Williams, 1999).

### **III. 3. Identification moléculaire des *Bacillus***

L'identification précise des pathogènes d'origine alimentaire, comme les espèces de *Bacillus*, est difficile en raison de leurs propriétés morphologiques et biochimiques similaires (Özdemir et Arslan, 2019; Hwang et Park, 2015 ; Peña *et al.*, 2014 ; Logan 2012 ; Heyndrickx, 2011; From *et al.*, 2005). À ce jour, l'identification et la caractérisation génotypique des espèces de *Bacillus* ont été étudiées par diverses méthodes moléculaires reposant sur le séquençage des gènes 16S ARNr, *gyrA*, *gyrB* et *rpoB* (Ogier *et al.*, 2019 ; Ozdemir et Arslan 2019 ; Kent *et al.*, 2016 ; Kovac *et al.*, 2016, Ivy *et al.*, 2012, Ki *et al.*, 2009 ; Adékambi *et al.*, 2008 ; Case *et al.*, 2007; Durak *et al.*, 2006). L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S est couramment utilisée pour l'identification et la construction de relations phylogénétiques entre les

espèces. Cependant, le séquençage du gène de l'ARNr 16S ne peut pas différencier entre des espèces ou des sous-espèces étroitement apparentées (Ogier *et al.*, 2019 ; Ivy *et al.*, 2012 ; Ki *et al.*, 2009 ; Case *et al.*, 2007; Durak *et al.*, 2006).

Les gènes de ménage (Housekeeping genes) utilisés comme marqueurs phylogénétiques, tels que *gyrB* (la protéine de sous-unité  $\beta$  de l'ADN gyrase) et *rpoB* (la protéine de sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase), sont généralement plus conservés parmi les espèces bactériennes que le gène de l'ARNr 16S (Ki *et al.*, 2009; Farrar et Reboli, 2006). Les séquences des gènes *gyrB* et *rpoB* offrent ainsi une haute résolution parmi les espèces étroitement apparentées des groupes *Bacillus* (Kent *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2013; Ivy *et al.*, 2012 ; Case *et al.*, 2007;). Dans des études précédentes, le séquençage de gènes domestiques s'est révélé plus approprié que le séquençage d'ARNr 16S pour discriminer certaines espèces de *Bacillus* (Ogier *et al.*, 2019; Ki *et al.*, 2009).

### **III. 4. Antibiorésistance *Bacillus***

Jusqu'à une période récente les antibiotiques étaient considérés comme un remède miracle. Malheureusement, aujourd'hui, l'usage abusif des antibiotiques a conduit à ce que l'on nomme « le paradoxe des antibiotiques » : ces substances travaillent à leur propre échec du fait qu'elles sélectionnent inévitablement les souches bactériennes qui leur résistent (EFSA, 2016 ; Veysseyre *et al.*, 2015). L'émergence accélérée de la résistance aux antibiotiques chez les *Bacillus* spp. représente une réelle menace pour la gestion des maladies infectieuses. Le traitement de certaines infections à *Bacillus* est compliqué par le fait qu'elles ont une évolution rapide et progressive avec une incidence élevée de multirésistance (Arslan *et al.*, 2014). La vancomycine, le chloramphénicol, la rifampicine, la clindamycine, la ciprofloxacine et la gentamicine peuvent être utilisées pour traiter les infections à *Bacillus*. Les pénicillines et les céphalosporines sont inefficaces, sauf contre *B. anthracis* qui est pratiquement sensible à la pénicilline (Farrar et Reboli., 2006). Les souches de *B. cereus* produisent des  $\beta$ - lactamases à large spectre (Bla1, Bla2, Bla3) et sont naturellement résistantes aux pénicillines et aux céphalosporines y compris celles de la troisième génération. L'imipénème est actif avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) basses, mais la métallo-enzyme bla2 est capable de dégrader faiblement les carbapénèmes (Bottone, 2010).

### **III. 5. Réglementation sur les *Bacillus* spp. dans la PLI**

L'US Dairy Export Council (USDEC) a mis en place des limites  $<2,7 \log$  UFC/g de spores thermophiles et  $<3 \log$  UFC/g de spores mésophiles pour le lait écrémé et le lait entier en poudre destinés aux préparations pour nourrissons en poudre (Watterson *et al.*, 2014). En Irlande, la Food Safety Authority of Ireland (FSAI) a mis en place un critère de spores aérobies dans le lait en poudre inférieur à  $4 \log$  UFC/g (FSAI, 2014). D'autre part, il convient de noter que le règlement (CE) n ° 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) 2073/2005 concernant les critères microbiologiques pour les denrées alimentaires établit un critère d'hygiène pour les présomptions de *Bacillus cereus* (EN / ISO 7932) pour les préparations pour nourrissons sèches et les aliments diététiques secs à des fins médicales destinés aux nourrissons de moins de 6 mois à la fin du processus de fabrication avec les paramètres suivants:  $m = 50 \text{ UFC/g}$ ,  $M = 500 \text{ UFC/g}$ ,  $n = 5$  et  $c = 1$ . Ce critère microbiologique est appliqué au niveau de l'Union Européenne (EFSA, 2016). La même limite maximale  $M = 500 \text{ UFC/g}$  est retrouvée dans la réglementation algérienne des critères microbiologiques applicables à *B. cereus* pour la poudre de lait infantile (JORA, 2017).



**Matériel  
&  
Méthodes**

La partie expérimentale de ce travail de recherche a été menée au sein des cinq laboratoires suivants :

- 1) Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire et l'Environnement (LAMAABE), Université Abou-BekrBelkaid-Tlemcen, Algérie.
- 2) Laboratoire de Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaire dans les zones semi-arides (VRVSA), Université Tahri Mohamed, Bechar, Algérie.
- 3) Laboratoire de Microbiologie Quantitative des Aliments, Faculté de Génie Alimentaire, université de Campinas, Brésil.
- 4) Laboratoire de Chimie Organique, Institut de Chimie, Université de Campinas, Brésil.
- 5) Laboratoire de Recherche Translationnelle et de Nouvelles technologies en Médecine et Chirurgie. Université de Pise, Italie.

## **I. Échantillonnage**

### **I.1. Étude de marché algérien de la poudre de lait infantile**

En Algérie la PLI est un produit importé, vendu dans des boîtes métalliques contenant généralement 400 g de produit. Durant l'année 2015, une enquête a été menée afin de cibler les marques les plus vendues (donc les plus consommées) en Algérie. Nous avons essayé de toucher le maximum de régions du pays : le Nord, Est, Centre, Ouest et le Sud.

L'enquête a visé les différentes marques de poudre de lait infantile (**PLI**) commercialisées sur le marché algérien, par une exploration statistique au niveau des points de ventes de la **PLI**, et aussi, un questionnaire-sur les choix de leurs marques de **PLI** préférées- destiné aux parents donnant à leurs enfants -en bonne santé- la PLI.

L'enquête à été menée sur plus de 100 points de vente répartis sur tous le territoire national. Par ailleurs, environ 2000 parents ont été questionnés. Pour ce faire, nous avons conçu et distribué des tableaux à renseigner afin de collecter les données nécessaires à la détermination des marques les plus consommées.

L'objectif principal de cette enquête était de déterminer les trois marques les plus vendues qui vont servir de base à l'échantillonnage de ce travail.

## I. 2. Prélèvement des échantillons

Dans le cadre de ce travail, 270 boîtes représentant 54 échantillons des trois marques les plus consommées que nous avons dénommées **PLI-1**, **PLI-2** et **PLI-3** ont été prélevés sur les points de vente durant la période allant de Janvier 2016 à Juin 2017. Les échantillons sélectionnés ne doivent pas avoir dépassé 50% de leur durée de vie. Pour chaque marque on a prélevé des PLI destinés à deux âges différents : PLI 1<sup>er</sup> âge destinée aux nouveaux nés jusqu'à l'âge de six mois, et les PLI 2<sup>ème</sup> âge destinées pour les nourrissons de six (06) à douze (12) mois d'âge (Figure2).

L'échantillonnage à été réalisé selon le plan de la figure 2 : 3 marques, 2 âges, 9 échantillons/âge/marque soit 54 échantillons. Chaque échantillon est constitué de 5 unités (boîtes) soit au total, 270 boîtes de poudre de lait acquises et analysées.

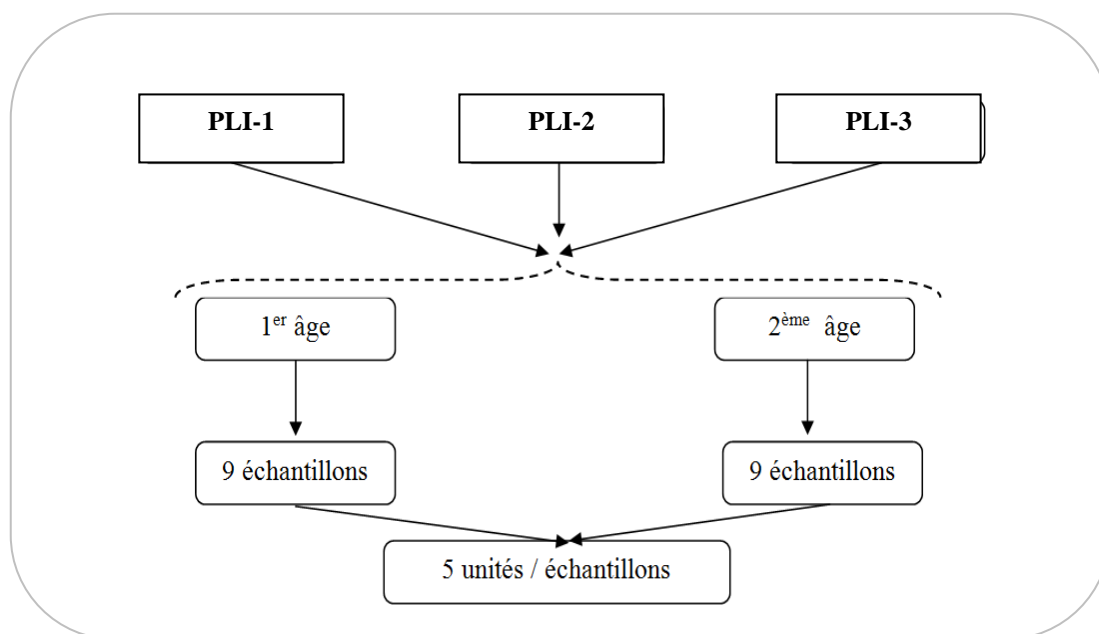


Figure 2 : Plan d'échantillonnage des PLI de trois marques

## II. Analyses microbiologiques

### II. 1. Préparation des échantillons

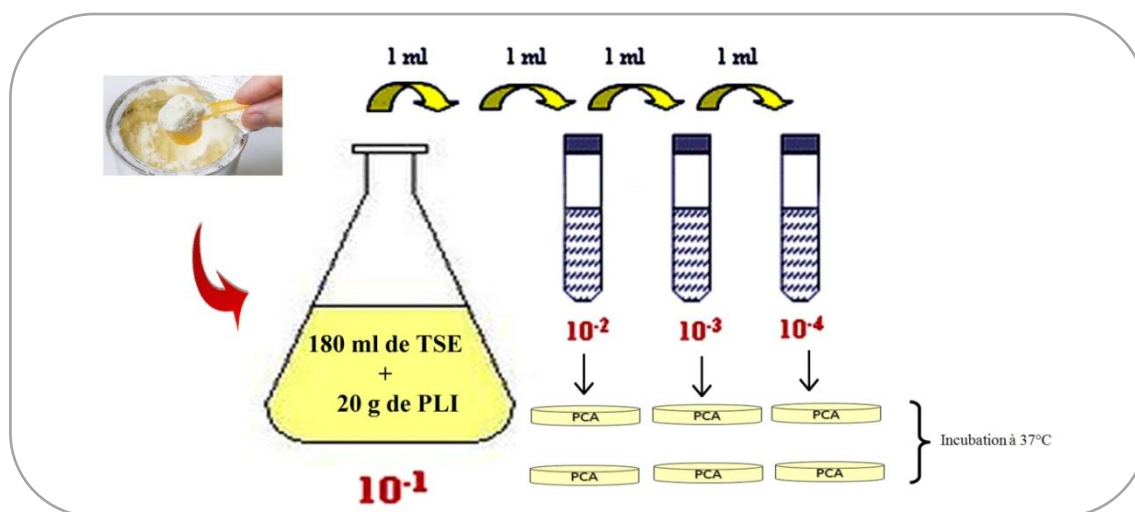
Pour chaque analyse effectuée, les échantillons ont été ramenés au laboratoire durant les deux heures qui précède les manipulations. Après la désinfection de la boîte métallique avec de l'alcool, on a pesé vingt 20 g de la PLI pour chaque unité analysée,



pour lesquels on a ajoutés à 180 ml de TSE (Tryptone, Sel, Eau) (Biokar, Beauvais Codex, France) dans un sac de Stomacher stérile, l'homogénéisation a été assurée par Stomacher (® 400 Circulator, Seward, UK) en utilisant 260 rpm/ min pendant 2 min, ce qui donne au final une dilution mère de  $10^{-1}$ . A partir de la dilution mère, une série de dilutions décimales successives ont été réalisées ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) dans le diluant maximum recovery (Biokar, Beauvais Codex, France) pour chaque unité.

## II. 2. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale FMAT

A partir des tubes des dilutions décimales préparés, on a mis aseptiquement 1 mL dans une boîte de Pétri vide auparavant étiquetée pour le repérage du numéro de l'échantillon, de l'unité et de la répétition. Après, on a versé environ 15 mL de milieu gélosé PCA « Plat Count Agar » (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) fondu et maintenu en fusion à  $45^{\circ}\text{C}$ . L'inoculum est mélangé avec la gélose, par agitation douce et circulaire sur la paillasse pour assurer l'homogénéisation. On a dupliqué les boîtes pour chaque dilution. A la fin on a laissé solidifier le milieu et on a incubé les boîtes à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h à 48h comme le montre la Figure 3.

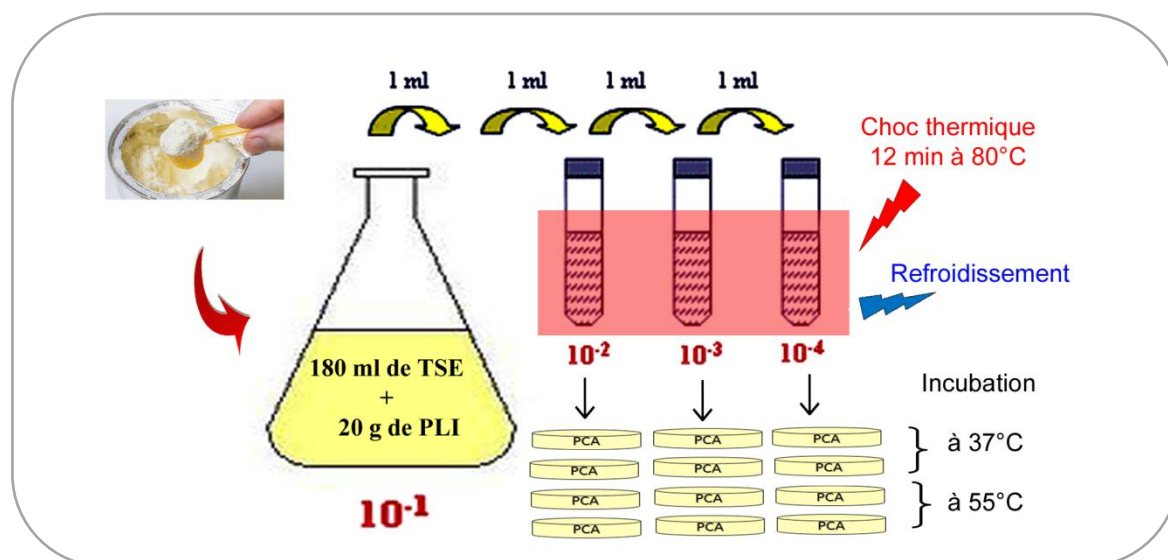


**Figure 3** : Préparation des dilutions et l'ensemencement des boîtes de Pétri pour le dénombrement de la FMAT

## II. 3. Dénombrement des spores aérobies

A partir de la solution mère après la reconstitution de la PLI, des dilutions en série ont été préparées rapidement dans le diluant maximum recovery (Biokar, Beauvais Codex, France) et soumises à un choc thermique de  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 12 min (Kent *et al.*, 2016), ce traitement permet d'éliminer la flore végétative présente dans la

PLI et de sélectionner les bactéries sporulées. Ensuite, les tubes ont été refroidis à température ambiante sous l'eau de robinet. De chaque dilution, à l'aide d'une micropipette contenant un embout stérile un volume de 0,1 mL d'inoculum a été ensemencé par étalement en surface de la boîte contenant du milieu PCA préalablement coulée et solidifiée dans des conditions d'asepsie sur la paillasse. Quatre boîtes ont été utilisées pour chaque dilution. Deux boîtes de chaque dilution ont été mises en incubation à 37°C pendant 24 à 48 h pour le comptage des spores mésophiles, et les deux autres boîtes incubées à 55° C pendant 24 à 48h (Figure 4) pour le comptage des spores thermophiles (Kent *et al.*, 2016). Le nombre de colonies de bactéries sporulées mésophiles et thermophiles a été compté et exprimé spores/g.



**Figure 4 :** Préparation des dilutions et l'ensemencement des boîtes de Pétri pour le dénombrement des spores aérobies

## II. 4. Lecture et interprétation

Les colonies des boîtes contenant entre 30 et 300 colonies, pour les deux dilutions successives. Le résultat est rapporté en UFC/g pour la flore mésophile aérobie totale et spore/g pour les spores aérobies l'aide la formule de la norme AFNOR (1994):

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

Où :

N: Nombre d'UFC/g ;

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

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

$n_1$  : Nombre des boîtes retenues à la première dilution;

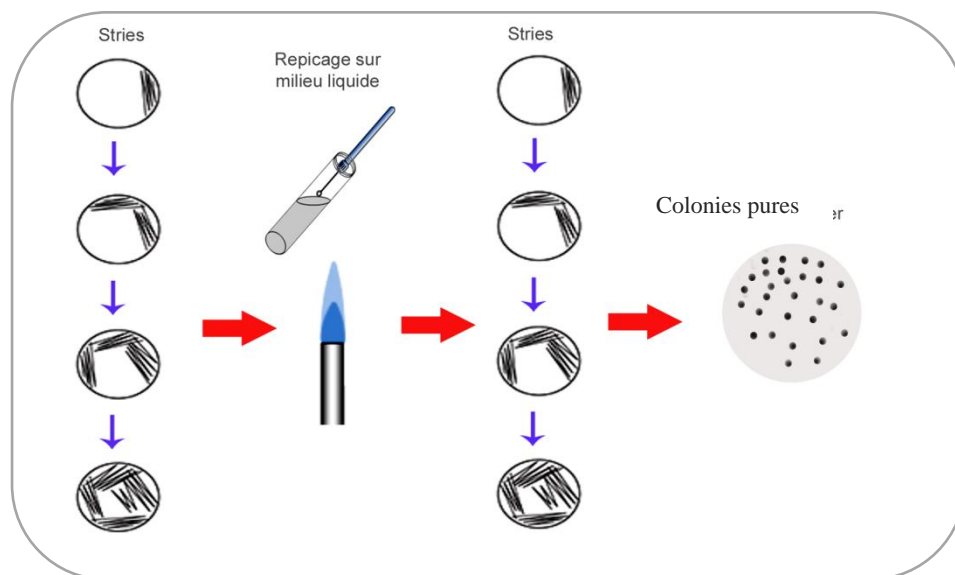
$n_2$  : Nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

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

## II. 5. Obtention des isolats

A partir des boîtes de Pétri ayant servi pour le dénombrement des spores aérobies, des colonies représentatives et de différents aspects ont été repérées et prélevées avec un maximum de cinq (05) colonies par boîte.

Les colonies prélevées sont repiquées dans le milieu BHI (bouillon au cœur-cerveau) (Biokar, Beauvais Codex, France) et incubées pendant 24h à 37°C pour les mésophiles et à 55°C pour les thermophiles. A partir de cette culture des stries ont été effectuées sur la gélose PCA (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) suivant la technique des quadrants comme illustré dans la figure 5.



**Figure 5** : Obtention des isolats par la technique des quadrants d'appauvrissement de la culture

L'incubation des cultures a été assurée à 37°C pendant 24h pour la flore mésophile, et à 55°C pour la flore thermophile pendant 24h. La sélection et l'isolement sont ainsi répétés jusqu'à l'obtention de colonies pures.

## **II. 6. Conservation des isolats**

Pour la conservation des isolats deux méthodes ont été utilisées :

### **II. 6.1. Cryoconservation**

Plus les températures seront négatives plus elles vont ralentir les réactions biochimiques cellulaires et les cinétiques des réactions deviennent très lentes, les évolutions sont lentes sur de nombreux mois même voir des années. On se base sur cette constatation pour conserver les souches.

Après la confirmation de la pureté des isolats, ces derniers ont été conservés par la méthode de la cryoconservation. La technique consiste à prendre quelques colonies des boîtes contenant des colonies pures et les transférer dans le milieu BHI (Oxoid, Basingstoke, UK) auquel on a additionné de glycérol préalablement préparé et versé dans des Eppendorf stériles (concentration finale du glycérol : 30%). Après avoir terminé l'opération dans des conditions d'asepsie et surtout s'être assuré qu'on a bien fermé les tubes Eppendorf, ces derniers ont été conservés à une température négative de -20°C (Gallagher et Wiley, 2008).

### **II. 6.2. Préparation des suspensions sporales**

La conservation des spores bactériennes dans de l'eau distillée stérile à 4°C, selon la méthode utilisée par Gaillard *et al.*, (1998) est résumée dans le protocole suivant:

- Un volume de 0,5 ml de la culture de la souche sur milieu BHI est étalé sur la surface d'une boîte de Pétri contenant le milieu PCA supplémenté par 40mg/l de MnSO<sub>4</sub> (Sulfate de manganèse) et 100 mg/l de CaCl<sub>2</sub> (Chlorure de calcium).
- Les boîtes ensemencées sont ensuite incubées à 37°C pour les mésophiles et à 55°C pour les thermophiles pendant un temps nécessaire à la sporulation de la population bactérienne. Le taux de sporulation sera estimé par observation au microscope à l'état frais après 05 jours d'incubation. Si ce taux des spores dépasse 90% à l'observation, la culture sera arrêtée.
- Les spores seront alors collectées à l'aide d'une spatule stérile en raclant la surface de la gélose et les spores récupérées sont mises en suspension dans un volume de 20 mL d'eau distillée stérile.
- La suspension de spores ainsi préparée est centrifugée à 10000 g pendant 15 min.

- Le culot est récupéré et remis dans 20 ml d'eau distillée stérile. Cette opération sera renouvelée deux fois. Le culot obtenu sera repris par un mélange eau/éthanol (V/V).
- On place le mélange à 4° C pendant 12h afin d'éliminer le reste des formes végétatives.
- Le mélange est centrifugé de nouveau à 10000g pendant 15min.
- Les culots obtenus vont subir une nouvelle fois trois cycles de lavage toujours à l'eau distillée stérile dans les mêmes conditions de la centrifugation.
- A la fin, les culots récupérés seront ensuite re-suspendus dans un volume minimum d'eau distillée stérile de façon à avoir une forte concentration en spores.

## **II. 7. Identification des isolats**

### **II. 7.1. Identification macroscopique**

L'identification macroscopique consiste en l'observation à l'œil nu ou sous une loupe des colonies bien isolées dont les caractères morphologiques sont des données qui permettent une première approche de l'identification. Les éléments d'identification macroscopiques observés sont: la forme, la taille, la couleur, l'élévation, l'opacité et la surface des colonies (Guiraud, 2012). Chaque observation se termine par la prise d'une photographie de la colonie.

### **II. 7.2. Identification microscopique**

#### **II. 7.2.1. Examen morphologique des isolats à l'état frais**

L'examen direct de la morphologie des isolats à l'état frais sous un microscope optique permet d'apprécier la forme des bactéries, leur mode de regroupement, leur abondance, leur mobilité éventuelle et la présence de spores avec leur aspect réfringent caractéristique.

L'examen direct consiste à déposer sur une lame porte-objet une goutte de suspension bactérienne. Cette lame est recouverte d'une lamelle-couvre-objet et la préparation est examinée avec un microscope optique aux objectifs 40x puis 100x avec l'huile à immersion.

## **II. 7.2.2. Coloration de Gram**

La coloration de Gram, bien qu'ancienne, est toujours utile puisqu'elle permet en plus d'observer la morphologie des bactéries, leur taille ainsi que leur mode de regroupement; de les différencier en deux groupes : les bactéries à Gram positif (**Gram+**) pourvues d'une couche de peptidoglycane épaisse et qui deviennent violettes et les bactéries à Gram négatif (**Gram-**) ayant une couche de peptidoglycane fine, et qui ne fixent pas le violet de Gentiane et prennent donc la couleur rose de la fushine.

A cet effet une coloration de Gram a été effectuée pour chaque colonie isolée. A la fin les lames sont examinées avec un microscope optique aux objectifs 40x ainsi que 100x avec l'huile à immersion (Prescott *et al.*, 2003).

## **II. 7.2.3. Coloration des spores bactériennes**

Les spores, sont imperméables et sont parfois visibles à la coloration de Gram sous la forme de zones non colorées bien délimitées à l'intérieur de la bactérie ou à l'extérieur. En observation à l'état frais, elles apparaissent très réfringentes.

Afin de mieux mettre en évidence les spores des isolats on a eu recours aux méthodes suivantes :

- **Coloration de spores au vert de Malachite**

Cette méthode nous permet de mettre en évidence les spores bactériennes qu'elles soient à l'extérieur ou à l'intérieur du corps bactérien. Son principe repose sur l'utilisation combinée de l'action de la chaleur et une forte concentration du colorant de vert de Malachite (Guiraud, 2012).

La technique consiste à réaliser, à partir d'une suspension sporale, un frottis et à le fixer sur une lame porte-objets. Ensuite, on recouvre la lame porte-objets d'une solution de vert malachite à 5% et on chauffe jusqu'à émission de vapeurs. On laisse refroidir et on re-chauffe à nouveau. L'opération de l'alternance doit durer environ 10 minutes. Après refroidissement, la lame subit un lavage à l'eau de robinet, et on termine par un séchage entre deux feuilles de papier absorbant. A la fin on observe la préparation au microscopique sous l'objectif 100x en utilisant l'huile à immersion. Les spores apparaissent alors en vert.

- **Mise en évidence des spores par le bleu de méthylène**

Les spores bactériennes peuvent également être mises en évidence dans les corps bactériens en faisant une simple coloration au bleu de méthylène. En effet, la spore n'est pas colorée et reste incolore dans un corps bactérien coloré au bleu de méthylène.

Après la réalisation d'un frottis, on recouvre la lame par le bleu de méthylène phéniqué pendant 1 minute, suivi par un rinçage à l'eau de robinet et un séchage entre deux feuilles de papier absorbant, on observe au microscope optique à l'objectif 100x en utilisant l'huile à immersion. Les spores apparaissent incolores dans un corps bactérien bleu.

## **II. 8. Tests biochimiques**

### **II. 8.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires**

#### **II. 8.1.1. La catalase**

La catalase est une enzyme qui dégrade l'eau oxygénée en eau et en oxygène moléculaire selon la réaction suivante :



Une réaction positive de la présence de la catalase se manifeste par la production des bulles d'oxygène, après mélange d'une culture bactérienne avec quelques gouttes d'eau oxygénée à 10 volumes (Leyral et Vierling, 2007).

#### **II. 8.1.2. Mise en évidence de l'oxydase**

La recherche de la cytochrome-oxydase a été effectuée à l'aide de disques « Oxydase » dont la zone réactionnelle est composée d'un papier filtre imprégné de N,N-diméthyl-1,4- phénylène diamine-dichlorure. A partir d'un milieu solide et à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée une partie de la colonie a été déposée sur un disque oxydase placé sur une lame. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet foncé (Joffin et Leyral, 2006).

## II. 8.2. Type respiratoire

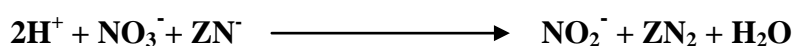
Le type respiratoire a été effectué selon le protocole de Guiraud, (1998). Le milieu gélosé Viande-Foie (VF) (Biokar, Beauvais Codex, France) réparti en tubes longs et fins est ensemencé après régénération et refroidissement à l'aide d'un ensemencement en inox en forme d'aiguille. L'ensemencement est plongé au fond du tube, puis remonté en décrivant une spirale. Le milieu est mis en incubation à 30 °C pendant 24 à 48 heures. La présence de la culture sur toute la hauteur indique un type respiratoire de type aéro-anaérobie facultatif (AAF). Si la culture a lieu seulement en haut du tube elle indique que la bactérie est aérobie stricte (AS). Si la culture est observée à 1 à 1,5 cm environ de la surface, l'isolat est considéré microaérophile. Si la culture est manifeste seulement au fond du tube cela suggère que la bactérie peut être anaérobie stricte.

## II. 8.3. Test « Mannitol mobilité »

Le mannitol est un produit de la réduction de D-mannose. Il permet de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et la mobilité. Pour ce faire, on a ensemencé les souches étudiées dans le milieu par piqûre centrale, puis incubation à 37°C pendant 24h. Le virage au jaune du milieu indique la fermentation du mannitol, une diffusion dans la gélose indique la mobilité des bactéries (Guiraud, 2012).

## II. 8.4. Recherche de nitrate réductase

Ce test consiste à mettre en évidence la présence ou non des nitrites dans le tube de mannitol mobilité après la lecture de ces deux paramètres. En ajoutant l'acide sulfanilique (Nitrate I) et lanaphtylamine (Nitrate II), ces réactifs portent le nom de réactifs de GRIESS, la réaction est positive **NR+** s'il y a apparition à la surface du milieu mannitol dans le tube une couleur rose-orangée. S'il n'y a pas cette couleur on va rechercher la disparition des nitrates par addition de poudre de zinc : en effet, le zinc réduit les nitrates en nitrites selon la réaction suivante (Buxton, 2011) :



### Lecture

- Coloration rose-orangé: on a donc eu transformation des nitrates en nitrites par le zinc. La bactérie ne possédait pas cette enzyme alors **NR-**



- Pas de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie au delà des nitrites. La bactérie possède cette enzyme alors NR+.

## **II. 9. Mise en évidence d'activités hydrolytiques extracellulaires**

La mise en évidence du pouvoir hydrolytique extracellulaire a été assurée par la recherche des enzymes suivantes :

### **II. 9.1. Recherche de l'amylase**

Cette enzyme a été recherchée en cultivant la bactérie en une strie droite de 3 à 4 cm de long sur une gélose nutritive (Biokar, Beauvais Codex, France) contenant 1% d'amidon. Après avoir obtenu une bonne culture bactérienne, le milieu a été recouvert d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'apparition d'une zone claire autour de la strie. Un résultat négatif se traduit par une couleur brune autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009 ; Farrar et Reboli, 2006).

### **II. 9.2. Recherche de la caséinase**

La recherche de cette enzyme a été effectuée sur la gélose nutritive (Biokar, Beauvais Codex, France) contenant 4% de poudre de lait écrémé. Après 48 heures d'incubation à 30°C, la présence de cette activité est détectée par une zone translucide autour de la strie indiquant l'hydrolyse de la caséine (De Jonghe *et al.*, 2010).

### **II. 9.3. Recherche de la lécithinase**

La mise en évidence de cette enzyme a été réalisée par l'ensemencement du germe en stries sur le milieu TSA (Tryptone-soja Agar) (Biokar, Beauvais Codex, France) additionnée de 8% de jaune d'œuf. Après 24 à 72 heures d'incubation à 30°C, l'apparition d'un halo de précipité blanchâtre (produits d'hydrolyse insolubles de lécithine) prouve que la souche possède la lécithinase (De Jonghe *et al.*, 2010).

## **II. 10. Test d'hémolyse**

Une gélose nutritive (Oxoid, Hampshire, UK) à laquelle on additionné 5% de sang est préparée et coulée dans des boîtes de Pétri, après refroidissement ces dernières sont ensemencées en faisant une strie au centre de la boîte de Pétri. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les colonies sont entourées par une zone claire correspondant à la libération de l'hémoglobine par les hémolysines de types  $\beta$  (Hwang et Park, 2015).

## **II. 11. Utilisation des galeries API 20E**

La recherche de la  $\beta$ -galactosidase (ONPG), de l'ornithine décarboxylase (ODC), de la lysine décarboxylase (LDC) et de l'arginine dihydrolase (ADH), la production d' $H_2S$ , l'utilisation du citrate, la production d'indole et la réaction de Voges-Proskauer, la liquéfaction de la gélatine et la dégradation des sucres ont été réalisés en utilisant la plaque API 20E (biomerieux - France).

La galerie API 20E composée de 20 microtubes contenant des milieux et substrats sous forme déshydratée et utilisée selon les recommandations décrites par le fabricant Biomerieux, (France). Les microtubes de la galerie API 20E sont inoculés avec une suspension bactérienne, après les plaques sont incubées selon la température de l'espèce pendant 24h à un intervalle temps de 48 h. Les réactions produites durant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs pour certains tests.

- **Technique**

Préparation de l'inoculum bactérien: une colonie bien distincte et bien isolée est prélevée à partir d'une culture jeune et mise dans 5ml d'eau physiologique, on finit par réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement la solution. L'opacité de la suspension bactérienne doit être équivalente à 0,5 McFarland. Cette suspension doit être utilisée extemporanément. Pour inoculer la galerie, il faut remplir à l'aide d'une micropipette les tubes et les cupules des tests CIT, VP et GEL avec la suspension bactérienne, et pour les autres tests; on remplit uniquement les tubes (et non les cupules), pour la création d'une anaérobiose dans les tests: ADH, LDC, ODC, URE,  $H_2S$ , on a rempli leur cupule par l'huile de vaseline stérile. Enfin, Les espèces mésophiles sont incubées à 37°C et les espèces thermophiles sont incubées à 55°C pendant 18-24 heures.

La lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture décrit par Biomerieux sur la notice fournie avec la galerie.

Il faut noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests suivant nécessitant l'addition de réactifs :

- Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

- Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats. Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

Les résultats obtenus constituent le profil biochimique des isolats qui seront supplémenté à d'autres tests pour servir à l'identification à l'aide du logiciel d'identification.

## **II. 12. Utilisation des galeries API 50 CHB**

La galerie API 50 CHB (biomerieux - France) est constituée de 50 microtubes permettant l'étude de la fermentation de substrat, appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acides uroniques).

- **Principe**

Entre deux à trois colonies bien isolées et parfaitement identiques de l'espèce à identifier sont mise en suspension dans 5 mL du milieu liquide « le medium » (biomerieux - France) fourni avec les plaques, après homogénéisation de la suspension une incubation préalable entre 4 à 6 h, puis inoculé la galerie selon les recommandations décrites par le fabricant.

Les espèces mésophiles sont incubées à 37°C et les espèces thermophiles sont incubées à 55°C pendant 24 h. Durant l'incubation, le catabolisme des glucides produit des acides organiques qui font virer l'indicateur de pH.

Pour la lecture on recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au JAUNE du rouge de phénol contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube n° 25), on observe un virage du rouge au NOIR. Les résultats obtenus constituent le profil biochimique des isolats et servent à son identification à l'aide du logiciel d'identification.

## **III. Réalisation d'un antibiogramme**

Le but de la réalisation d'un antibiogramme est de prédire la sensibilité d'une bactérie à un ou plusieurs antibiotiques dans une optique essentiellement sanitaire mais également pour la surveillance épidémiologique de la résistance bactérienne et

l'identification bactérienne par la mise en évidence des antibiogrammes. Pour cela la méthode de diffusion par disque a été utilisée en suivant le protocole expérimenté par Chon *et al* (2012) afin de tester la sensibilité des souches de *Bacillus cereus* vis-à-vis des antibiotiques choisis.

- **Choix des antibiotiques**

Huit (08) antibiotiques ont été testés sur les souches isolées : Pénicilline G (P) (10 µl), Vancomycine (VA) (30µl), Tétracycline (TE) (30µg), Chloramphénicol (C) (30µg), Erythromycine (E) (15µg), Gentamycine (GEN) (10µg), Kanamycine (K) (30µg), Clindamycine (C) (02µg) (Zhao *et al.*, 2020 ; Alanber *et al.*, 2019 ; Arslan *et al.*, 2014 ; Chon *et al.*, 2012, Patel *et al.*, 2009) .

- **Préparation de l'inoculum**

- ✓ A partir d'une culture pure de 18 à 24 h sur milieu d'isolement approprié, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- ✓ Bien décharger l'anse dans un tube de 5 mL d'eau physiologique stérile.

- ✓ Bien homogénéiser la suspension bactérienne, et l'opacité de la suspension doit être équivalente à 0,5 McF.

- **Ensemencement**

- ✓ Tremper un écouvillon stérile dans le tube contenant l'inoculum.

- ✓ L'essorer en le pressant fermement (et on le tournant) contre la paroi interne du tube, afin de charger au maximum.

- ✓ Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas, en stries serrées.

- ✓ Répéter l'opération 2 fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

- ✓ Presser chaque disque d'antibiotique à l'aide de pinces stériles et ne pas déplacer les disques après application.

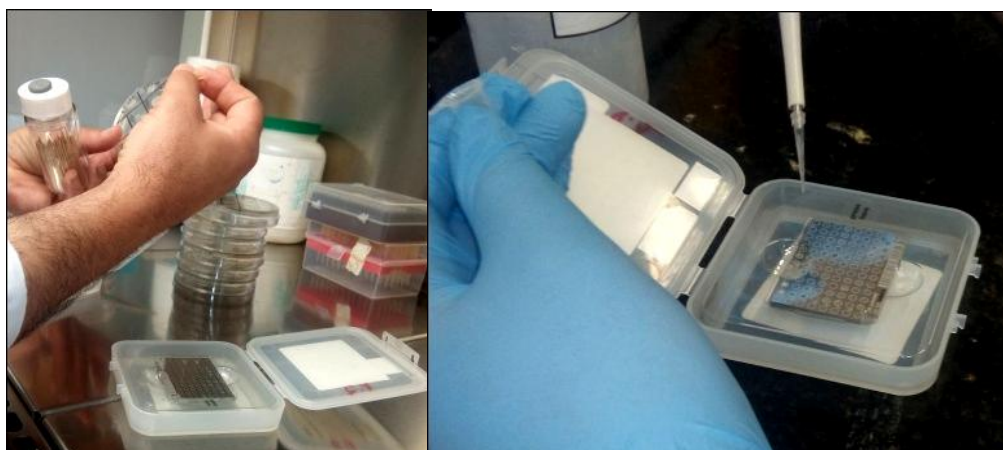
- **Lecture**

Après 24 heures d'incubation à 37°C, la lecture de l'antibiogramme a été effectuée en faisant la mesure des diamètres des zones d'inhibition selon le protocole suivi par Chon *et al* (2012) ainsi que le protocole suivi par Patel *et al* (2009).

#### IV. Identification des isolats par la technique MALDI-TOF MS

**MALDI-TOF MS** (en anglais Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry) est une technique spectrométrique de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization) et un analyseur à temps de vol (TOF MS, time-of-flight mass spectrometry). L'une des caractéristiques importantes d'une spectrométrie de masse est la finesse des pics, mesurée par la résolution du spectromètre de masse. La résolution est définie comme étant le rapport de la masse  $m$  du pic sur la largeur à mi-hauteur  $\Delta m$ . Plus la résolution est élevée, plus les pics sont fins (Singhal *et al.*, 2015).

Dans cette recherche, cent vingt isolats ( $n = 120$ ) ont été identifiés par la méthode MALDI-TOF selon le protocole proposé par Celandroni *et al* (2019). Pour chaque isolat, une colonie a été déposée sous forme de spot en deux fois sur la plaque MALDI (Bruker, Bremen, allemand), puis chaque spot a été recouvert de 1  $\mu\text{L}$  de solution matricielle saturée d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) à 10 mg / mL (Bruker, Brême, allemand) et séché à l'air (voir Figure 6). Chaque isolat a été testé en double. La plaque chargée de spots a ensuite été placée dans l'équipement MALDI-TOF MS (Bruker, Brême, allemand) comme indiqué par les instructions du fabricant. Les spectres de masse ont été automatiquement acquis à une fréquence laser de 60 Hz avec une plage d'acquisition de 1.960 à 20.000 Da en mode linéaire positif en 5-10 minutes. Les spectres générés ont été traités dans le logiciel associé MALDI Biotyper (version 3.1) (Bruker, Bremen, allemand) et analysés selon le modèle standard du système de base de données.



**Figure 6 :** Mise en place des colonies sous forme de spot sur la matrice MALDI TOF et l'ajout de la solution matricielle

Le MALDI Biotyper est un logiciel pour l'analyse des spectres dans le contexte d'une identification microbienne ; il utilise et permet de générer différentes banques de données pour produire, à partir des spectres, des listes de pics ou des références de spectres. De plus, le logiciel permet l'analyse de pics basée sur la génération des principaux composants et sur l'indice de corrélation des composants. Il incorpore toutes les fonctionnalités pour réaliser l'acquisition du spectre de masse, et donne ainsi l'identification et la classification des microorganismes.

## **V. Analyses moléculaires**

### **V. 1. Extraction de l'ADN génomique**

A partir d'une culture de 18 h à 37 °C sur milieu BHI, on a effectué des stries sur le milieu GN (Neogen, Heywood, UK) et incubé les boîtes pendant 6 h à 37 °C. Dans des conditions aseptiques, à l'aide d'une anse de platine, trois à quatre colonies bien isolées et parfaitement identiques ont été prélevées de la boîte de GN mises en suspension dans un Eppendorf contenant 150 µL d'eau ultra-pure stérile. La suspension est bien agitée à l'aide d'un vortex.

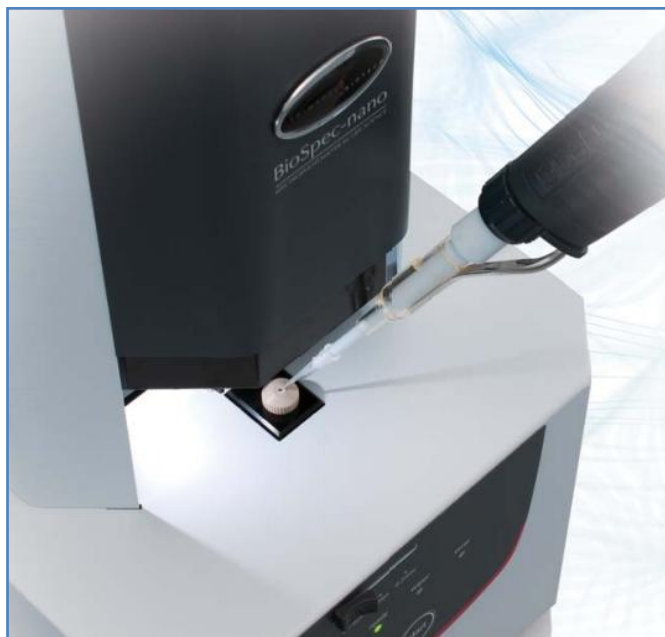
Afin de lyser complètement les cellules, la suspension bactérienne contenue dans l'Eppendorf a été chauffée à ébullition dans de l'eau bouillante pendant 20 minutes puis fortement agitée et mise rapidement à une température de -80°C pendant 40 minutes. Après l'écoulement du temps de la congélation, on a attendu jusqu'à ce que la suspension retrouve son état liquide pour l'homogénéiser à l'aide d'un vortex. Juste après, les échantillons ont été centrifugés à 12000g, pendant 30s à 4 °C (Thermo Fisher, Osterodeam Harz, Allemagne). A la fin, l'ADN génomique contenu dans le surnageant a été récupéré par une micropipette pourvue d'un embout stérile et les débris cellulaires représentés par le culot ont été éliminés. L'ADN a été conservé à -20°C jusqu'au moment de son utilisation.

### **V. 2. Quantification et vérification de la pureté de l'ADN**

La concentration en ADN de l'échantillon est estimée par spectrophotométrie. Les acides nucléiques présentent un pic d'absorption dans l'ultraviolet à 260nm. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio A260/A280 est utilisé pour estimer la pureté de

l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8 tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les glucides, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio A260/A230 devrait être d'environ 2,2.

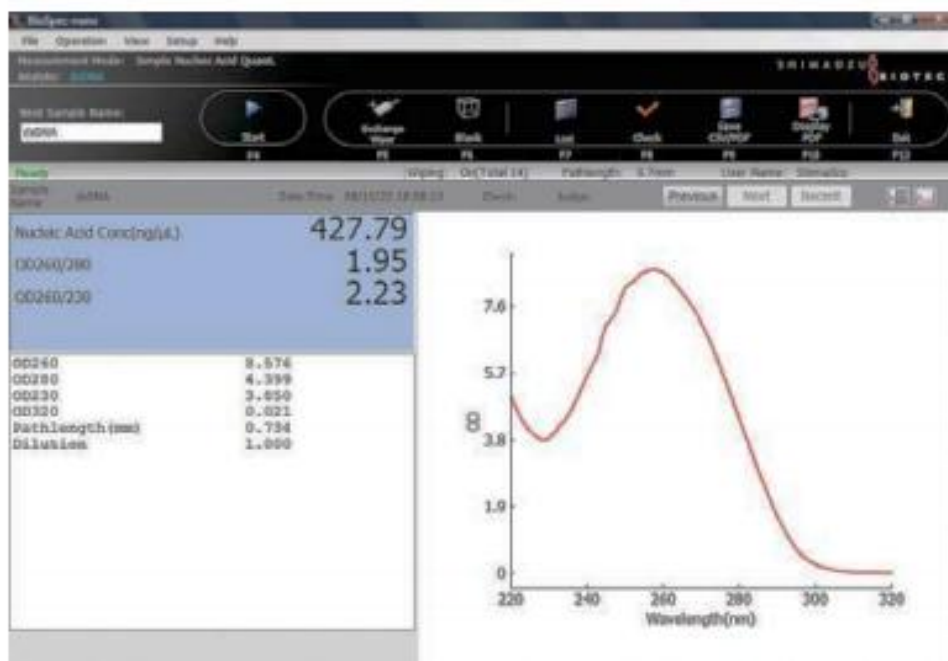
Donc afin de contrôler la quantité l'ADN génomique obtenu, on l'a dilué dans de l'eau pure pour aboutir à une concentration qui doit être entre 50 et 100 ng/ $\mu$ L pour chaque échantillon, on a fini par effectuer des mesures par un spectrophotomètre d'absorption moléculaire lié à l'ordinateur (BioSpec-nano Chimadzu, Nishinokyo Japon), un automate " Drop and Click" spécifique pour le contrôle de la quantité et la qualité des acides nucléiques avec une prise d'échantillons extrêmement faible. Pour cela, il suffit de déposer dans l'appareil 1 $\mu$ l d'ADN comme illustré dans la Figure 7 pour déterminer sa concentration et obtenir la courbe qui renseigne sur sa pureté, l'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8 et la concentration doit être comprise entre 50 et 100 ng/ $\mu$ L pour chaque échantillon.



**Figure 7 :** Mise en place de l'échantillon d'ADN pour la quantification. Image de Spectrophotometer for Life Science BioSpec-nano C101-E112C

Les résultats de l'analyse sont automatiquement affichés sur l'écran de l'ordinateur une fois la mesure terminée, avec génération d'un PDF pour enregistrer les résultats de l'échantillon (voir Figure 8).





**Figure 8** : Affichage des résultats après la mesure de l'échantillon d'ADN. Image de Spectrophotometer for Life Science BioSpec-nano C101-E112C

### V. 3. Recherche des gènes de virulence

La présence et l'expression des gènes de toxicités contribuent au caractère pathogène de la bactérie. Ces gènes sont détectés généralement dans certaines souches du groupe *Bacillus cereus* impliquées dans les toxi-infections et considérées comme d'importants pathogènes d'origine alimentaire (Pei *et al.*, 2018 ; Hwang et Park, 2015 ; Farrar et Reboli, 2006; Hilliard *et al.*, 2003 ).

Dans cette étude, la recherche des gènes de virulences a été réalisée sur cent vingt isolats de *Bacillus* (n = 120) obtenus des PLIS et ayant auparavant été identifiés par la technique de MALDI TOF MS. Les gènes recherchés sont : *cytK* (Cytotoxine K), *bceT* (*B. cereus* enterotoxin), *entFM* (enterotoxin FM), *nheA*, *nheB* et *nheC* (non-hemolytic enterotoxin) et *hblA*, *hblB* et *hblC* (hemolysin BL) (Ngamwongsatit *et al.*, 2008 ; Minnaard *et al.*, 2007 ; Guinebretière *et al.*, 2002). Les amorces utilisées dans cette étude sont listées dans le tableau 5 avec la température d'hybridation et leurs tailles en paires de bases.



**Table 5:** Amorces des gènes de virulences ciblés dans cette étude

Gène	Amorce	Sequence de l'amorce (5'-3')	T (°C) d'hbridation	Taille (bp)	Référence
<i>bceT</i>	ETF ETR	TTACATTACCAGGACGTGCTT TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	56	428	Minnaard <i>et al.</i> , 2007
<i>entFM</i>	ENTA F ENTB R	ATGAAAAAAGTAATTTGCAGG TTAGTATGCTTTTGTGTAACC	52	1269	Minnaard <i>et al.</i> , 2007
<i>nheA</i>	nheA 344S F nheA 843A R	TACGCTAAGGAGGGGCA GTTTTTATTGCTTCATCGGCT	55	499	Minnaard <i>et al.</i> , 2007
<i>nheB</i>	nheB 1500 S F nheB 2269 A R	CTATCAGCACTTATGGCAG ACTCCTAGCGGTGTTCC	55	769	Minnaard <i>et al.</i> , 2007
<i>nheC</i>	nheC 2820 S F nheC 3401 S R	CGGTAGTGATTGCTGGG CAGCATTCGTACTTGCCAA	55	581	Minnaard <i>et al.</i> , 2007
<i>hblA</i>	HblA F HblA R	AAGCAATGGAATACAATGGG AGAATCTAAATCATGCCACTGC	56	1154	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
<i>hblB</i>	HblB F HblB R	AAGCAATGGAATACAATGGG AATATGTCCCAGTACACCCG	58	2684	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
<i>hblC</i>	HblC F HblC R	GATAC(T, C)AATGTGGCAACTGC TTGAGACTGCTCG(T, C)TAGTTG	58	740	Guinebretière <i>et al.</i> , 2002
<i>cytK</i>	FCytK R2CytK	CGACGTCACAAGTTGTAACA CGTGTGTAATACCCAGTT	54	565	Ngamwongsatit <i>et al.</i> , 2008

### V. 3.1. Amplification par PCR

Le processus d'amplification PCR a été effectué conformément aux instructions du protocole proposé par Minnaard *et al* (2007) pour les gènes *bceT*, *entFM*, *nheA*, *B* et *C*, *hblA*, *B* et *C*). Le volume par réaction était de 10 µL et le mix de chaque milieu réactionnel contient: 1 µL d'ADN génomique, 1 µL de tampon PCR (20 mM TRIS–HCl, 50 mM KCl, pH: 8.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), 0.2 µL de dNTPs avec une concentration de 0.2 mM pour chaque nucléotide, 1 µL pour chaque amorce (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil) et 1 U de Taq polymérase qui est l'équivalent de 0.2 µL (Tampon PCR, dNTPs, *Taq*: Cellco, Sao Paulo, Brazil).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Applied Biosystems, Marsiling, Singapore) en utilisant les conditions suivantes: pour la dénaturation 3 min à 94 °C, 94 °C durant 30 s pour 30 cycles, 30 s pour l'hybridation des amorces tel que mentionné dans le tableau 1 (pour chaque primer une température correspondante), 30s à 72 °C pour l'élongation de l'ADN et 72 °C pendant 5 min pour l'extension finale (Minnaard *et al.*, 2007).

Pour le processus d'amplification du gène *CytK*, on a suivi la méthode développée par Ngamwongsatit *et al* (2008), la réaction avait un volume final de 20 µL, contenant 5 µL d'ADN génomique, 2 µL de tampon PCR (20 mM TRIS-HCl, 50 mM KCl, pH: 8.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM), 0.4 µL pour chaque dNTP avec une concentration de 200 µM, 0.8 µL pour chaque amorce 0.4 µM et 1 U de Taq polymérase qui est l'équivalent de 0.2 µL (Tampon PCR, dNTPs, *Taq*: Cellco, Sao Paulo, Brazil). Les réactions ont été effectuées dans un thermocycleur (AppliedBiosystems, Marsiling, Singapore) 95°C for 5 min pour la denaturation initiale, 94°C pendant 45 s pour 30 cycles, 1 min à 54°C pour l'hybridation des amorces, 72°C pendant 2 min pour l'élongation de l'ADN et 72°C for 5 min pour l'extension finale (Ngamwongsatit *et al.*, 2008).

### **V. 3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%**

Les produits de l'amplification par PCR sont révélés sur un gel d'agarose à 1% (voir composition en annexe 1) qui est coulé après sa préparation dans une cuve d'électrophorèse (Loccus, Sao Paulo, Brazil) munie d'un peigne capable de former 22 puits sur le gel. Après solidification et avoir enlevé le peigne, 5 µL de marqueur de taille (Cellco, Sao Paulo, Brazil) sont déposés dans le premier et le dernier puits, et chaque 5µL d'échantillons est mélangé par 1µL de colorant de charge (Cellco, Sao Paulo, Brazil) sur un morceau de parafilm avec une micropipette et déposé dans un puits. Comme témoins positifs, nous avons utilisé *Bacillus cereus* ATCC 14579 pour toutes les amorces. A la fin le gel est immergé dans une solution tampon de migration TAE 50X (Trisacétate-EDTA 1M).

La migration des amplicons a été effectuée sous tension de 90V pendant 60 min. La visualisation du gel a été révélée sous la lampe UV d'un transmetteur de la lumière UV (Loccus, Sao Paulo, Brazil) relié à un appareil photo numérique géré par ordinateur pour prendre l'image finale du résultat obtenu sur le gel.

## **V. 4. Typage des isolats par le séquençage du gène *rpoB***

### **V. 4.1. Amplification par PCR**

Pour l'amplification du gène *rpoB*, nous avons sélectionné 35 souches dont certaines contiennent des gènes de toxicité, d'autres non. Nous avons utilisé les amorces *rpoB1206* (5'-ATC GAA ACG CCT GAA GGT CCA AAC AT-3') et *rpoB3202* (5'-ACA CCC TTG TTA CCG TGA CGA CC-3') (Sigma-Aldrich, Sao Paulo, Brazil).

Le protocole suivi est celui proposé par *Ki et al* (2009), le mélange de PCR contenait 1  $\mu$ L d'extrait d'ADN, 1.25 U de Taq polymérase, 0.25 mM de dNTPs, 0.1  $\mu$ M of pour chaque amorce et et le tampon PCR (20 mM TRIS–HCl, 50 mM KCl, pH : 8.4, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM) pour faire un volume total de 25  $\mu$ L (Tampon PCR, dNTPs, Taq : Cellco, Sao Paulo, Brazil).

La PCR a été effectuée par un thermocycleur (AppliedBiosystems, Marsiling, Singapore) selon les conditions suivantes : pour la denaturation 95 °C durant 3 min, 35 cycles à 95 °C for 20 s, 55 °C for 30 s pour l'hybridation des amorces, et 72 °C et 1.5 min pour l'élongation de l'ADN, avec une extension finale à 72 °C pendant 5 min.

#### **V. 4.2. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1%**

Deux  $\mu$ L de chaque échantillon du produit de PCR ont été mélangés avec 1 $\mu$ L de colorant de charge (Cellco, Sao Paulo, Brazil) et déposés dans un puits de gel d'agarose en présence d'un marqueur de taille. A la fin, le gel a été soumis à une électrophorèse (Loccus, Sao Paulo, Brazil) sous tension de 90V pendant 60 min. La visualisation du gel a été effectuée sous la lampe UV d'un transmetteur de la lumière UV (Loccus, Sao Paulo, Brazil) relié à un appareil photo numérique géré par ordinateur pour prendre l'image finale du résultat obtenu sur le gel.

#### **V. 4.3. Purification et séquençage**

Avant de séquencer nos produits PCR, il a fallu les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase. La purification des produits de la PCR a été assurée par PCR Purification Kit - S Pack (Cellco, Sao Paulo, Brazil), conçu pour la purification des réactions de PCR (élimination des oligo-nucléotides, oligo-dimères, nucléotides, protéines, sel et autres impuretés). La préparation est basée sur la technologie de la membrane de silice pour la liaison à l'ADN dans un environnement à haute salinité et l'éluion dans un tampon à faible salinité. Le kit fournit un moyen simple et efficace de purifier l'ADN circulaire ou linéaire dans une large gamme de tailles (100 pb - 10 kpb) et est optimisé pour des quantités d'ADN jusqu'à 20  $\mu$ g. Les échantillons ont été quantifiés avec un spectrophotomètre (BioSpec-nano Chimadzu, Nishinokyo Japon) et envoyés pour le séquençage au laboratoire « Central Laboratory of High-Performance Technologies (LACTAD) » à Sao Paulo, Brazil.

Les séquences obtenues du gène *rpoB* ont été déposées à la base de données GenBank de NCBI pour l'identification des bactéries.

#### **V. 4.4. Analyse phylogénétique**

Les séquences résultant des amorces *rpoBI206* et *rpoBR3202* ont été assemblées en contigs en utilisant le logiciel *Bio Edit Sequence Alignment Editor* version 7.2.5. Les contigs ont été soumis à la base de données BLAST / NCBI pour la recherche des séquences de référence les plus proches basées sur la similitude des nucléotides. Les relations phylogénétiques ont été déterminées à l'aide de l'algorithme de voisinage, les analyses phylogénétiques et moléculaires pour la construction de l'arbre ont été effectuées à l'aide du logiciel MEGAX Version 10.1.8 (Kumar *et al.*, 2018). Les séquences génétiques *rpoB* obtenues des isolats ont été déposées dans la base de données GenBank sous l'ID de soumission: 2356319.

#### **VI. Analyses statistiques**

Les données de numération bactérienne totale et de numération des spores aérobies ont été exprimées en moyenne  $\pm$  écart type. Les résultats ont été évalués par le test ANOVA. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel R (version 3.6.0). Le test de Duncan à 95% du niveau de confiance a été appliqué.

L'analyse partielle la moins discriminante avec validation croisée PLS-DA (Coimbra *et al.*, 2020) a été utilisée pour évaluer la classification des gènes de toxines selon les marques de la PLI en considérant une matrice de données comportant six lignes (marques) et neuf colonnes (gènes de toxines).

L'analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLS-DA) est une méthode de régression PLS classique dans laquelle la matrice d'empreintes digitales ( $I \times J$ ) X est considérée comme une matrice de prédicteur, et une matrice de réponse Y spécialement construite ( $I \times K$ ) comprend catégorique (dummy) variables qui décrivent les appartenances aux classes K (Granato *et al.*, 2018). Cette analyse a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT 2020.1 (Adinsoft, Paris, France).



**Résultats  
&  
Discussion**

## I. Analyse microbiologiques

Au total, 54 échantillons de trois marques différentes de PLIs commercialisées en Algérie ont été étudiés. Les analyses microbiologiques effectuées ont ciblés le dénombrement de la flore aérobie mésophile totale et les bactéries aérobies sporulées en dénombrant les bactéries aérobies sporulées mésophiles et bactéries aérobies sporulées thermophiles, le but est d'évaluer, la charge microbienne totale de la PLI, qui renseigne sur l'hygiène des procès ainsi que la prévalence de la flore aérobie sporulée dans ce produit alimentaire.

### I. 1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale FMAT

Les résultats du dénombrement de la FMAT pour les échantillons de la PLI analysés par le test de Duncan sont résumés dans le Tableau 6.

**Tableau 6:** Résultats du test Duncan pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries aérobies sporulées thermophile (BAST) pour les marques PLI-1, PLI-2 et PLI-3.

Marques <sup>1</sup>	Moyennes en log <sub>10</sub> ufc/g	Moyennes en log <sub>10</sub> spore/g	
	FMAT	BASM	BAST
PLI-1	3.3 ± 0.8A*	3.1 ± 0.6 A*	2.5 ± 0.5B*
PLI-2	3.2 ± 0.4 A*	3.0 ± 0.5 A*	2.7 ± 0.4 A*
PLI-3	3.2 ± 0.6 A*	2.5 ± 0.6B*	2.3 ± 0.5B*

\* Les résultats sont exprimés en moyenne ± écart-type (n = 54).

Les moyennes avec une même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes par le test de Duncan (valeur p > 0.05) ".

<sup>1</sup>Ingrédients. **PLI-1** : Lactosérum déminéralisé, lait partiellement écrémé, graisses végétales (palme, soja, coprah, tournesol), lactose, maltodextrines, protéines de lactosérum, minéraux (carbonate de calcium, chlorure de magnésium, phosphate dipotassique, calcium chlorure, hydroxyde de calcium, sulfate de magnésium, hydroxyde de potassium, fer lactate, sulfate de zinc, phosphate de calcium, gluconate de cuivre, gluconate de manganèse, iodure de potassium, sélénite de sodium), lécithine de soja, vitamines (A, D3, E, K1, C, B1, B2, PP, B5, B6, biotine, acide folique, B12), choline, taurine, inositol, L-carnitine, extrait riche en tocophérols. **PLI-2** : Protéine de lactosérum, caséine, mélange d'huiles végétales, choline, taurine, inositol, L-carnitine, 12 minéraux et 13 vitamines. **PLI-3** : Lactose, crème (lait), maltodextrine, lait écrémé, huiles végétales (colza, tournesol oléique, tournesol), protéines de lait solubles, minéraux (phosphate tricalcique, sulfate de magnésium, citrate trisodique, chlorure de calcium, hydroxyde de potassium, sulfate de zinc, sulfate ferreux, sélénite de sodium, iodure de potassium, cuivre sulfate de manganèse), huile de poisson, huile de *Mortierella alpina*, lécithine de soja, vitamines (C, PP, B5, A, B12, E, K, B1, B6, D, B9, H),

chlorure de choline, antioxydants (palmitate d'ascorbyle, tocophérols) (SOJA), inositol, L-carnitine.

Pour les trois marques de PLI, les charges de la FMAT des échantillons variaient entre  $< 2 - 4.7 \log_{10}$  ufc/g, et la moyenne enregistrée était de  $3.2 \log_{10}$  ufc/g. L'analyse statique appliquée dans cette recherche qui est le test de Duncan a révélé que la FMAT entre les trois marques de PLI étudiées (**Tableau 6**) n'était pas significativement différentes ( $p>0.05$ ). Aussi, selon l'âge de PLI (**Tableau 7**), le compte de la FMAT entre les trois marques n'a pas montré une différence significative ( $p>0.05$ ). Le premier constat de ce résultat révèle un point très important, c'est que malgré les différences dans les ingrédients utilisés pour la fabrication de la PLI du 1<sup>er</sup> âge et la PLI du 2<sup>ème</sup> âge la charge de la FMAT n'a pas exprimé une variation remarquable pour les deux âges.

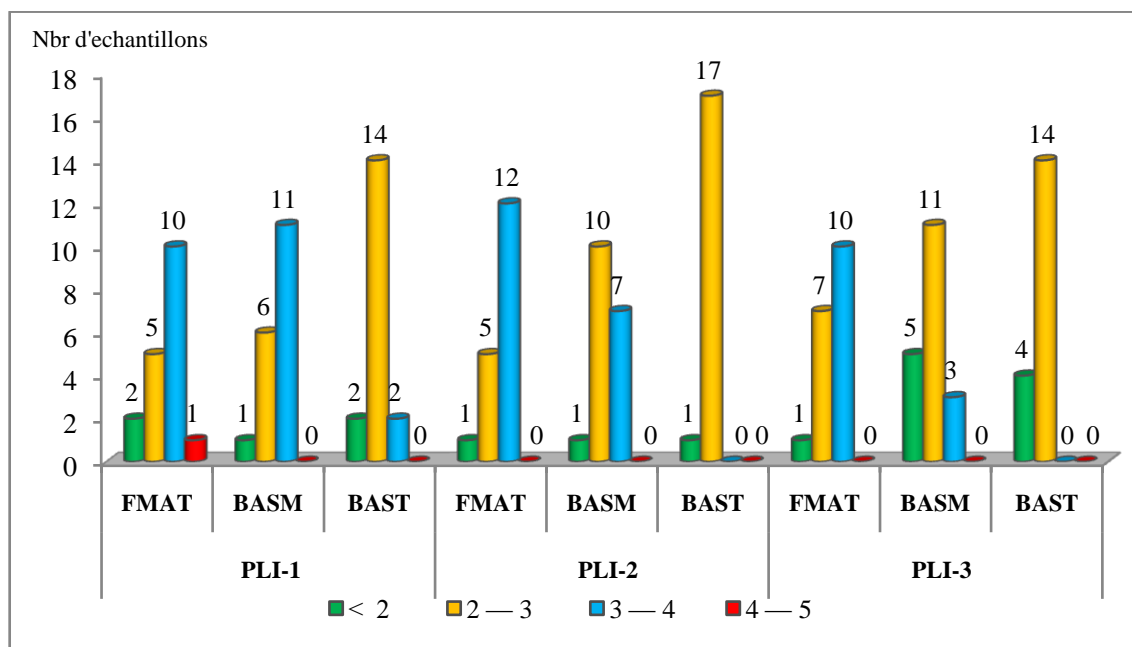
Par ailleurs, les valeurs de la FMAT les plus élevées ont été détecté dans les échantillons de la PLI du 2<sup>ème</sup> âge, et comme le **Tableau 7** l'indique, on note que les moyennes de charge de la FMAT des échantillons de la PLI du 2<sup>ème</sup> âge sont légèrement plus élevées à celle des échantillons de la PLI pour le 1<sup>er</sup> âge. Ce qui est due probablement à l'importance et la rigueur du traitement thermique appliqué par les fabricants pour la PLI destiné aux enfants de 1<sup>er</sup> âge, vu la fragilité des nouveaux né durant les premier mois qui suivent la naissance.

**Tableau 7:** Résultats du test de Duncan pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les bactéries sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries sporulées thermophile (BAST) dans trois marques par rapport aux deux âges de la PLI.

Ages de PLI	Marques	log <sub>10</sub> ufc/g	log <sub>10</sub> spore/g	
		FMAT	BASM	BAST
1 <sup>er</sup> âge	PLI-1	2.9 ± 0.9A*	2.9 ± 0.8A*	2.7 ± 0.6A*
	PLI-2	2.9 ± 0.6A*	2.8 ± 0.4A*	2.5 ± 0.3A*
	PLI-3	3.0 ± 0.5A*	2.3 ± 0.6A*	2.0 ± 0.4B*
2 <sup>ème</sup> âge	PLI-1	3.6 ± 0.2A*	3.1 ± 0.2A*	2.3 ± 0.1B*
	PLI-2	3.4 ± 0.6A*	3.2 ± 0.6A*	2.9 ± 0.3A*
	PLI-3	3.4 ± 0.6A*	2.6 ± 0.7B*	2.7 ± 0.3A*

D'autre part, la distribution de la charge de la FMAT dans les échantillons de la PLI des trois marques (**Figure 9**), nous avons constaté que 98.2% (53) des échantillons avait une charge inférieure à  $4 \log_{10}$  ufc/g, où on distingue 7.4% (04) avec

une charge au dessous de 2 log<sub>10</sub> ufc/g, 31.5% (17) avait une charge qui se située entre 2 et 3 log<sub>10</sub> ufc/g, 59% (32) contenaient une charge entre 3-4 log<sub>10</sub> ufc/g et 1.8% (01) qui représente un seul échantillon avait une charge qui dépasse 4 log<sub>10</sub> ufc/g, sachant que ce dernier appartient aux échantillons de la PLI de deuxième âge.



**Figure 9:** Distribution des charges de FMAT (log<sub>10</sub> ufc/g), BASM et BAST (log<sub>10</sub> spore/g) au sein des échantillons de la PLI des trois marques.

La PLI joue un rôle primordial quand l'allaitement maternel n'est pas possible, elle est fabriquée avec beaucoup d'exigences afin que sa composition se rapproche le maximum possible du lait de la maman (Kent *et al.*, 2015). C'est un aliment qui est destiné pour nourrir les nouveaux nés jusqu'à l'âge de l'introduction d'un régime alimentaire varié (Becker *et al.*, 1994). La PLI est un produit alimentaire comme tout autre aliment, peut contenir des microorganismes de différents types avec des charges qui varient en fonction de la contamination et d'autres facteurs divers (Costa *et al.*, 2020; Chitrakar *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2018; Sadiq *et al.*, 2016; Chap *et al.*, 2009; Iversen et Forsythe, 2004). Actuellement, la technologie de fabrication de la PLI ne permet pas la production d'un produit totalement dépourvu en microorganismes (CAC, 2008). Commenant par l'air qui circule dans l'usine de fabrication de la PLI ; il peut être un moyen de transfert potentiel des micro-organismes vers le produit final (Wu *et al.*, 2018), sachant que la principale contamination des poudres de lait est celle qui se produit au niveau du post-traitement, car des températures létales qui éliminent les cellules végétatives des agents pathogènes ne sont appliquées que pour la matière



première dans le cas du processus de mélange à sec et au cours du traitement pour processus de mélange humide (WHO et FAO, 2008).

Le dénombrement de la FMAT dans les échantillons de la PLI fournit des informations utiles sur l'état d'hygiène des étapes de transformation et le niveau des bonnes pratiques de fabrication appliquées au niveau de l'usine (Buchanan et Oni, 2012; CAC, 2008). Parmi les 54 échantillons analysés dans cette étude, un seul échantillon contenait une charge de la FMAT estimée à  $4.7 \log_{10}$  ufc/g, dépassant ainsi la norme exigée par la réglementation algérienne. Cependant, tous les autres échantillons avaient une charge de la FMAT qui ne dépassait pas la valeur maximale de  $4 \log_{10}$  ufc/g stipulée par la réglementation algérienne sur les critères microbiologiques applicables aux PLI dont le critère relatif à la FMAT dans les préparations destinées aux nourrissons stipule un plan d'échantillonnage à trois classes avec  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^3/g$  et  $M = 10^4/g$  (JORA, 2017 ; CAC, 2008).

Dans la présente étude, les valeurs de la FMAT obtenues sont généralement en accord avec celles obtenues par Iversen et Forsythe (2004), où 98% des échantillons avaient une charge  $< 4 \log_{10}$  ufc/g. L'auteur et son collaborateur ont examiné 82 échantillons de PLI, et ils ont rapporté que 92% des échantillons avaient une charge  $< 3 \log_{10}$  ufc/g, 19.51% se situent entre  $3 - 4 \log_{10}$  ufc/g et 2.3% contenaient un nombre supérieur à  $4 \log_{10}$  ufc/g. Chap et ses collaborateurs en 2009, ont étudié 136 échantillons de lait infantile provenant de différents pays, ils ont constaté que tous les échantillons brésiliens avaient une charge microbienne totale  $< 2 \log_{10}$  ufc/g, à l'exception d'un échantillon qui contenait une charge de  $2$  à  $3 \log_{10}$  ufc/g. Pour les échantillons britanniques, la FMAT variait entre  $< 2 - < 4 \log_{10}$  ufc/g, avec 58%  $< 2 \log_{10}$  ufc/g, 31.5% entre  $2$  à  $3 \log_{10}$  ufc/g et 10.5% entre  $3$  à  $4 \log_{10}$  ufc/g. En revanche, des valeurs de la FMAT élevées ont été détectées dans les échantillons malaisiens, 33.3% se situant entre  $4 - 5 \log_{10}$  ufc/g et 25%  $> 5 \log_{10}$  ufc/g.

Nos résultats corroborent également avec ceux rapportées par Oluwole et ses collaborateurs en 2013 dans une étude similaire qui a révélé que le taux de la FMAT variait entre  $2 \log_{10}$  ufc/g à  $4 \log_{10}$  ufc/g. Aussi dans un autre travail sur la PLI, Abdullah Sani *et al* (2013), ont trouvés des taux de la FMAT qui variaient entre  $< 2 \log_{10}$  ufc/g à  $3,9 \log_{10}$  ufc/g pour le 1er âge, et des valeurs  $< 2 \log_{10}$  ufc/g et d'autres valeurs  $> 4 \log_{10}$  ufc/g ont été détectés dans les échantillons du 2<sup>ème</sup> âge.

Dans d'autres études, tous les échantillons de la PLI et d'aliments pour nourrissons examinés par Haughton *et al* (2010), Sadek *et al* (2018) et Rowan *et al* (1997), immédiatement après la reconstitution, ont exprimé des moyennes de la FMAT qui étaient  $< 3 \log_{10}$  ufc/g. Les microorganismes de la FMAT représentent en grande partie des bactéries sporulées qui ont survécu aux traitements thermiques et / ou des bactéries non sporulées qui ont recontaminé le produit après l'étape du traitement thermique (Buchanan et Oni, 2012) Généralement, la charge de la FMAT diminue avec le degré du traitement thermique appliqué et la rigueur des conditions d'hygiène suivies. La qualité microbiologique est l'un des paramètres les plus importants pour les aliments destinés aux nourrissons (Wu *et al.*, 2018; Sadek *et al.*, 2018; Townsend et Forsythe, 2008; CAC, 2008 ). Les nourrissons sont des consommateurs avec un système immunitaire en cours de développement qui n'a pas encore formé une flore intestinale concurrente. (Vidic *et al.*, 2020 ; Ahern *et al.*, 2019 ; Wu *et al.*, 2018; Hwang et Park., 2015; Townsend et Forsythe., 2008). La PLI est considérée comme l'un des aliments à risque élevé en raison de son important contenu protéique et surtout qu'il est destiné à des sujets vulnérables (Newell *et al.*, 2010). Des infections bactériennes chez des nourrissons associées à la consommation de PLI contaminée ont été confirmées par des études épidémiologiques (Cahill *et al.*, 2008). Ainsi, les PLI peuvent constituer un véhicule pour la transmission d'agents pathogènes (Oluwole *et al.*, 2013). Du point de vue de la sécurité sanitaires et des toxi-infections alimentaires ce produit représente un risque élevé pour les nourrissons.

A partir de nos résultats on confirme encore une autre fois, si besoin est, que les PLI ne sont pas des aliments stériles et peuvent abriter et véhiculer des bactéries pathogènes et qu'il faudra manipuler comme un aliment à risque élevé pour la santé des nourrissons et les enfants de bas âge.

## **I. 2. Dénombrement des spores aérobies**

La recherche des bactéries aérobies sporulées a révélé leur présence dans tous les échantillons testés des PLI. Pour les trois marques, les charges variaient entre 1 et  $4 \log_{10}$  spores/g, avec une moyenne de  $2.9 \log_{10}$  spores/g pour les bactéries aérobies sporulées mésophiles et une moyenne de  $2.5 \log_{10}$  spores/g pour les bactéries aérobies sporulées thermophiles.

Selon le test de Duncan appliqué dans ce travail, les résultats montrent que la charge en bactéries aérobies sporulées mésophiles n'était pas significativement

différente pour les échantillons des marques PLI-1 et PLI-2 ( $p > 0.05$ ). Cependant, la charge en spores mésophiles était significativement différente par rapport aux échantillons PLI-3 ( $p < 0.05$ ). Aussi, pour les bactéries aérobies sporulées thermophiles, nous avons constaté que la charge des échantillons de la PLI-2 étaient significativement différentes par rapport aux échantillons de PLI-1 et PLI-3 ( $p < 0.05$ ) (**voir Tableau 6**).

La comparaison des moyennes entre bactéries aérobies sporulées mésophiles et bactéries aérobies sporulées thermophiles, a montré que la charge des thermophiles dans les trois marques était inférieure à celle des mésophiles (**Tableau 6**). D'autre part, les moyennes des charges les plus élevées pour bactéries aérobies sporulées mésophiles pour les trois marques ont été détectées dans les échantillons du 2<sup>ème</sup> âge (**Tableau 7**). Ce constat est déjà relevé pour la FMAT, ce qui indique probablement l'importance du traitement thermique appliquée pour la PLI du 1<sup>er</sup> âge par rapport à la PLI de 2ème âge. Il y a lieu aussi de souligner qu'il n'y avait pas de différence significative entre les échantillons du 1<sup>er</sup> âge pour toutes les marques concernant bactéries aérobies sporulées mésophiles. En faisant la comparaison entre les trois marques testées, on a remarqué que la PLI-3 était celle qui était la moins contaminée.

En ce qui concerne la distribution des charges des bactéries aérobies sporulées au sein des échantillons de la PLI des trois différentes marques (**Figure 9**), on a constaté que 63% et 96% des échantillons pour les mésophiles et les thermophiles respectivement ne dépassé pas  $3 \log_{10}$  spores/g. La charge des spores était  $< 4 \log_{10}$  spores/g. Pour les bactéries aérobies sporulées mésophiles ; 13% (7) des échantillons étaient  $< 2 \log_{10}$  spores/g, 50% (27) se situaient entre 2 et  $3 \log_{10}$  spores/g, 37% (20) entre 3 et  $4 \log_{10}$  spores/g. Pour les bactéries aérobies sporulées thermophiles, 13% (7) des échantillons avec un compte  $< 2 \log_{10}$  spores/g, 83.33% (45) variaient entre 2 -  $3 \log_{10}$  spores/g, 3.7% (2) entre 3 -  $4 \log_{10}$  spores/g.

En général, la variation des charges de spores entre les marques étudiées peut s'expliquer par les principaux composants présents dans chacun des trois PLIs testés. Alors que la PLI-1 et le PLI-2 contenaient du lait partiellement écrémé, du lactosérum déminéralisé ou des protéines de lactosérum comme ingrédients principaux, la PLI-3 contenait des ingrédients raffinés tels que le lactose, la crème (lait) et la maltodextrine comme ingrédients principaux. Le lait partiellement écrémé, le lactosérum déminéralisé ou les protéines de lactosérum sont connus comme des sources courantes de spores bactériennes (Zain *et al.*, 2016, McHugh *et al.*, 2018), tandis que les trois

premiers ingrédients utilisés pour fabriquer la PLI3 sont plus transformés (lactose et maltodextrine) ou moins concentrés (crème de lait), présentant probablement un nombre faible de bactéries aérobies sporulées.

La flore aérobie sporulée persiste dans les poudres de lait par la formation d'une endospore : cet état physiologique lui permet d'échapper à certains traitements thermiques comme la pasteurisation, ainsi, elles sont très souvent présentes dans les denrées alimentaires traitées thermiquement (Pereira et Sant'Ana., 2018; Checinska *et al.*, 2015; Hwang et Park., 2015; Watterson *et al.*, 2014).

Il a été observé que les bactéries aérobies sporulées représentent la majorité des bactéries aérobies mésophiles totales dans les PLIs avec une présence principalement marquée par des espèces du genre *Bacillus* (Haughton *et al.*, 2010). On s'attendait à ce que la charge des bactéries aérobies sporulées thermophiles soit plus faible que celle des bactéries aérobies sporulées mésophiles, car ses dernières semblent figurer parmi la flore de base des ingrédients utilisés. En accord avec d'autres résultats, il a été rapporté que presque tous les échantillons testés contenaient des bactéries aérobies sporulées (Sadek *et al.*, 2018 ; Sadiq *et al.*, 2016 ; Haughton *et al.*, 2010). Même après le traitement thermique du lait, les spores bactériennes seront présentes dans le produit final (Zhuang *et al.*, 2019 ; Alvarenga *et al.*, 2018 ; McHugh *et al.*, 2017; Haughton *et al.*, 2010).

La contamination de la PLI peut provenir de sources intrinsèques ou extrinsèques. Les sources intrinsèques comprennent les matières premières, les ingrédients, la manipulation et la contamination environnementale survenue pendant la fabrication (Lu *et al.*, 2019 ; Zhuang *et al.*, 2019; Cho *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2014 ; Buchanan et Oni, 2012; WHO et FAO., 2008; Becker *et al.*, 1994) tandis que la contamination extrinsèque se produit lors de la manipulation et de la préparation de la PLI dans les foyers et même dans les unités de soins intensifs, ayant généralement des réservoirs qui peuvent être de l'environnement ou le personnel (Masood *et al.*, 2015, Di Pinto *et al.*, 2013)

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Sadiq *et al* (2016), ces chercheurs ont examiné douze (12) échantillons de PLI, et le nombre des spores aérobies mésophiles variait entre 2.1 à 4 log<sub>10</sub> spores/g avec une moyenne de 3.7 log<sub>10</sub> spores/g. Ils ont également rapportés que 58% des échantillons analysés avaient une charge > 2 - < 3 log<sub>10</sub> spores/g, 25% > 3 - < 4 log<sub>10</sub> spores/g et 16.6% > 4 - < 5 log<sub>10</sub> spores/g. Le nombre de spores aérobies thermophiles variait entre 1.7 à 4.1 log<sub>10</sub>

spores/g et la moyenne a été estimée à 3.4 log<sub>10</sub> spores/g. Ils ont également constaté que 16.6% étaient <2 log<sub>10</sub> spores/g, 33.3% ≥ 2 - <3 log<sub>10</sub> spores/g, 41.6% ≥ 3 - <4 log<sub>10</sub> spores/g et 8.3% ≥ 4 - <5 log<sub>10</sub> spores/g. D'autres études ont également rapporté des charges en spores aérobies mésophiles s'étalant de 1.1 à 3 log<sub>10</sub> spores/g, avec une moyenne de 2.1 log<sub>10</sub> spores/g (Sadek *et al.*, 2018).

Cho *et al* (2018) ont rapporté que pendant la fabrication de la PLI, des spores aérobies mésophiles et thermophiles ont été détectées à toutes les étapes du process, avec une charge de 0.8 à 1.2 log<sub>10</sub> spores/g pour les matières premières et entre 2 à 4.4 log<sub>10</sub> spores/g pour le produit final. Ils ont également détecté une variation entre les usines concernées par l'étude : entre 1.2 et 2.0 log<sub>10</sub> spores/g pour l'usine A; 1.2 et 4.4 log<sub>10</sub> spores/g pour l'usine B; 0.8 et 2.6 log<sub>10</sub> spores/g pour l'usine C.

Kent *et al* (2016) ont examiné 55 échantillons de lait cru et 33 échantillons de poudre de lait provenant de transformateurs de poudre de lait à travers les États-Unis. Ils ont conclu que la moyenne logarithmique des spores aérobies dans la poudre lait américaines variait de 1.1 à 3.4 log<sub>10</sub> spores/g. Logiquement, la charge de spores dans le produit final est égale à une partie de la charge initiale du lait cru et à la contamination possible qui a survenue lors de la transformation de la PLI jusqu'au produit final.

Les spores bactériennes et surtout celle de *B. cereus* indiquent le statut de qualité et de sécurité des poudres de lait (Sadiq *et al.*, 2018 ; Hwang et Park, 2015; Watterson *et al.*, 2014 ; Burgess *et al.*, 2010). En raison de leur omniprésence et leur résistance à plusieurs stress environnementaux, y compris les températures élevées, pH bas et la faible activité de l'eau, les spores bactériennes sont bien adaptées pour survivre aux divers environnements rencontrés lors de la production de poudre lait (Burgess *et al.*, 2010 ; Setlow, 2006). La présence des spores thermorésistantes dans le lait en poudre représente un souci pour l'industrie laitière, en particulier par la formation de biofilms et leurs potentiels d'altération (Burgess *et al.*, 2010). Par ailleurs, plusieurs études ont identifié des biofilms formés par des bactéries sporulées sur les équipements comme une source importante de spores bactériennes dans les poudres de lait. (Burgess *et al.*, 2010 : Scott *et al.*, 2007). Pour cela, une meilleure compréhension des étapes de traitement auxquelles les spores contaminent les poudres lait fournirait des informations pertinentes qui seraient utiles pour développer des stratégies de maîtrise des contaminations améliorées.

Sur la base de tous ces constats, on peut dire que le traitement thermique utilisé dans la fabrication des PLI n'affecte en aucun cas la totalité des spores aérobies, et si les conditions de croissance sont favorables après reconstitution de la PLI, les spores peuvent germer et la charge bactérienne augmentera avec le risque de dépasser la limite de  $5 \log_{10}$  ufc /g considérée comme une dose toxique. Dans de telles situations, les souches pathogènes ont également l'opportunité de se multiplier. Pour ces raisons, l'imposition de faibles niveaux de spores dans les matières premières a été identifiée comme une approche importante pour réduire les charges de spores dans le produit fini (Watterson *et al.*, 2014).

À cette fin, l'US Dairy Export Council (USDEC) a mis en œuvre des limites de  $<2,7 \log$  ufc/g de spores thermophiles et  $<3 \log$  ufc/g de spores mésophiles pour le lait écrémé et entier en poudre destiné à la manufacture de la PLI (Watterson *et al.*, 2014). La Food Safety Authority of Ireland (FSAI) a mis en œuvre une réglementation pour le nombre de spores aérobies dans le lait en poudre, qui doit être inférieur à  $4 \log_{10}$  ufc/g (FSAI, 2014).

### **I. 3. Caractérisation phénotypique des isolats**

#### **I. 3.1. Résultats des examens macroscopiques**

Les isolats obtenus par une culture aérobie ont été précédés par un choc thermique de  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 12 min afin de sélectionner la flore sporulée présente dans la PLI (Watterson *et al.*, 2014).

L'identification morphologique a d'abord consisté en un examen macroscopique par l'observation directe à l'œil nu de l'aspect des colonies obtenues.

Les isolats indiquaient la présence d'aspects macroscopiques très hétérogènes en formes, en couleurs et en textures.

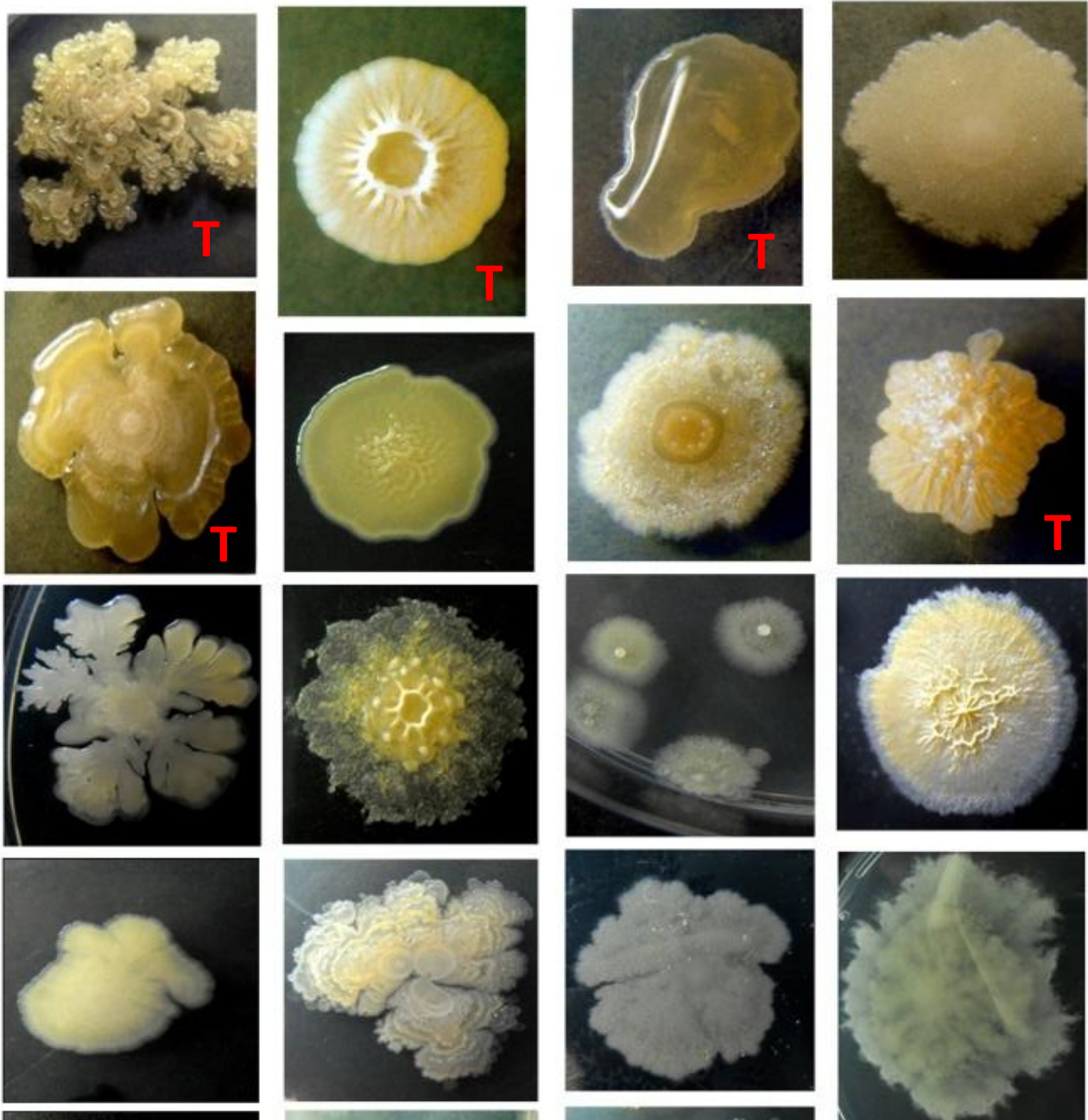
Certaines colonies ont des contours ; lobés, froissés, rhizoïdes, déformés, ondulés. Pour la texture de la surface on a observé des aspects crémeux, visqueux, granulés, secs. D'un autre côté, différentes formes ont été révélées, dont quelques-unes sont régulières, d'autres irrégulières, avec différentes tailles, petites et moyennes. Pour ce qui est de la couleur certaines sont blanchâtres, grisâtres, crème.

Les reliefs des colonies également été diversifiés, dont certaines sont bombées aux centres, pour d'autres c'est toute la colonie qui est bombée et d'autres sont planes (**Figure 10**).

## *Résultats et discussion*

Les communautés bactériennes présentent une variété de morphologies de croissance dans la construction des colonies selon différentes conditions environnementales et dépend aussi de l'état du milieu de culture qui peut être un milieu solide, semi-solide ou liquide. Des études sur les mécanismes d'auto-organisation et les stratégies de contrôle de la population microbienne ont fait état de réseaux de gènes soutenant la différenciation cellulaire (Tasaki *et al.*, 2017).



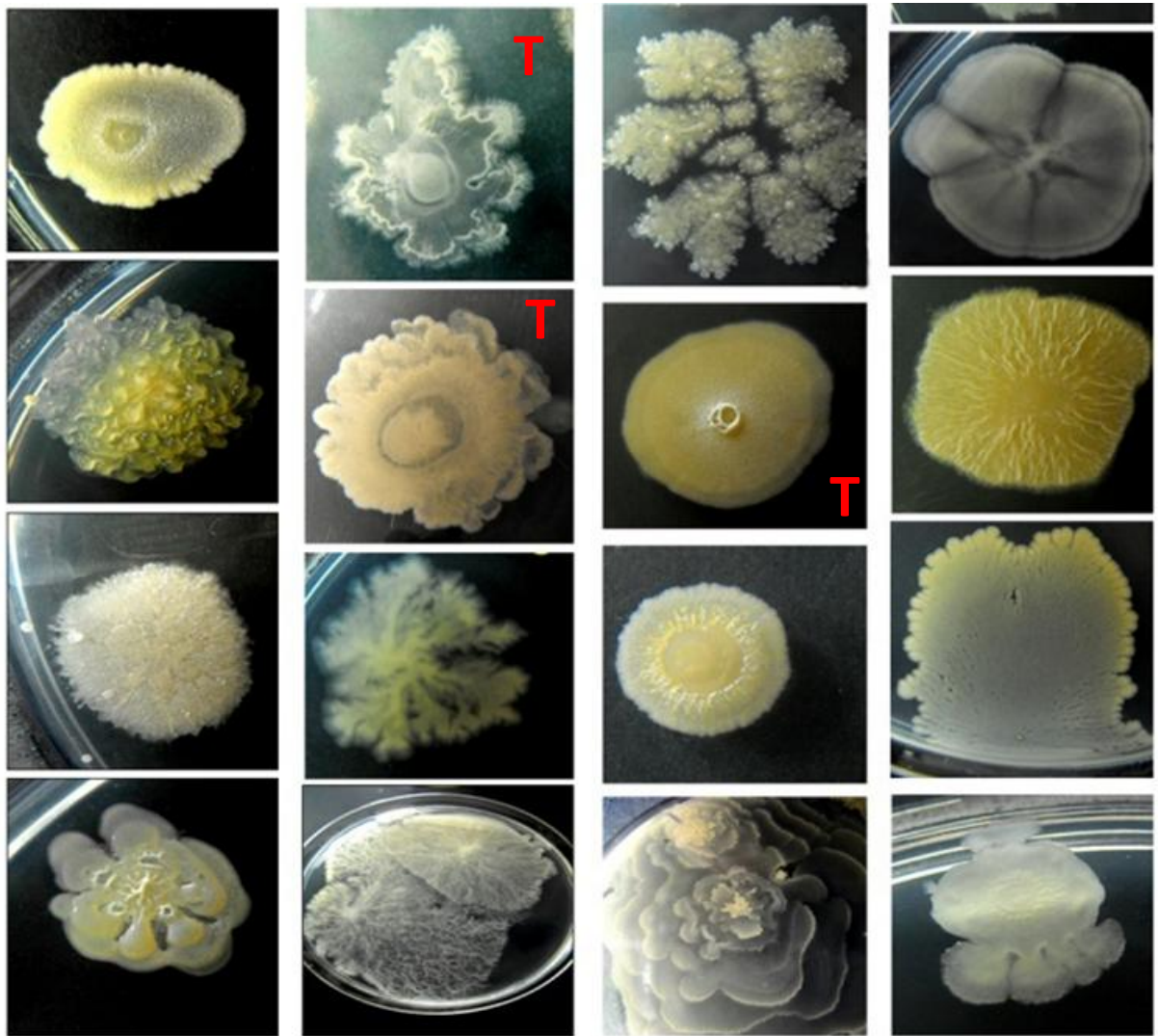


**Figure 10.** Différents aspects morphologiques de colonies de la flore aérobie sporulée inféodée aux poudres de lait infantiles commercialisées en Algérie (Photos : crédit personnel)

Incubation à sur milieux PCA (Plate count Agar) 37°C pour les mésophiles et 55° C de 24 à 48h.

**T** : Incubation à 55C°





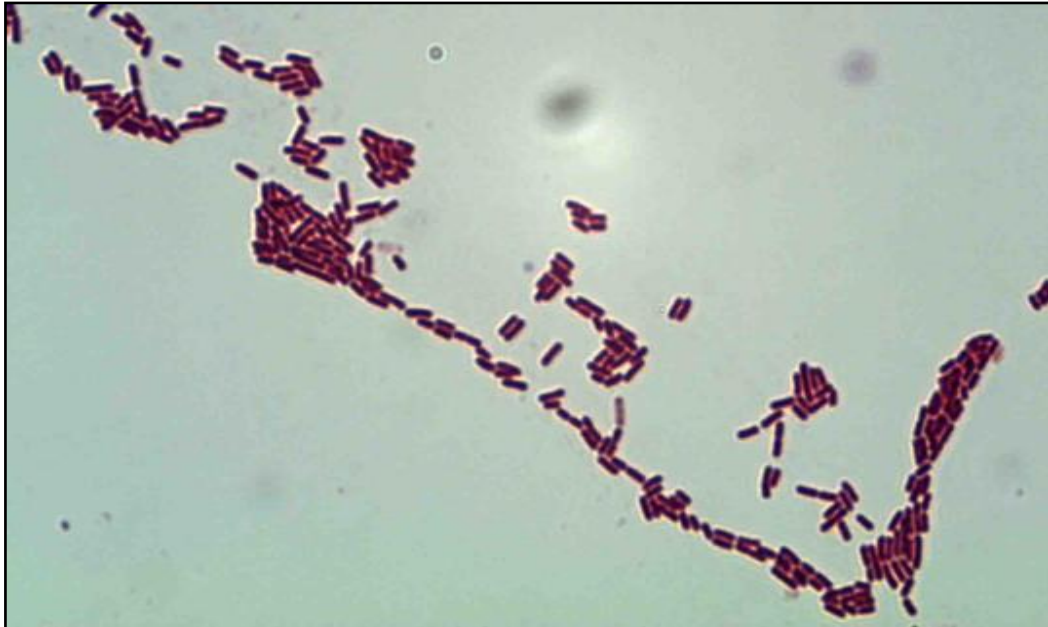
**Figure 10 (suite).** Différents aspects morphologiques de colonies de la flore aérobie sporulée inféodée aux poudres de lait infantiles commercialisées en Algérie (Photos : crédit personnel)

Incubation à sur milieu PCA (Plate count Agar) 37°C pour les mésophiles et 55° C de 24 à 48h.

**T** : Incubation à 55C°

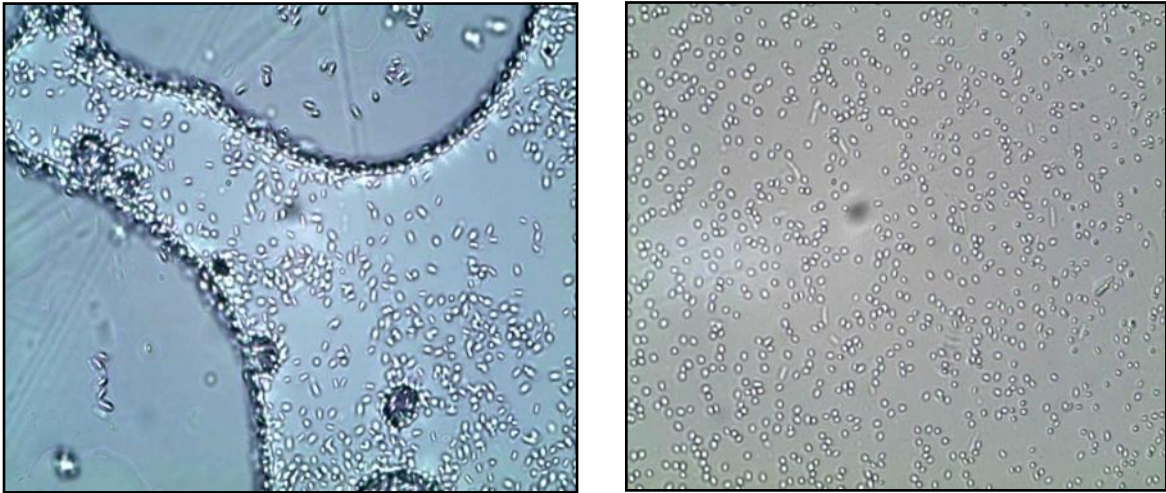
### I. 3.2. Résultats des examens microscopiques

Les examens microscopiques ont révélé que les isolats étaient des bâtonnets à Gram positif, regroupés en longues chaînes, en chaînettes en paires ou isolées (voir **Figure 11**).

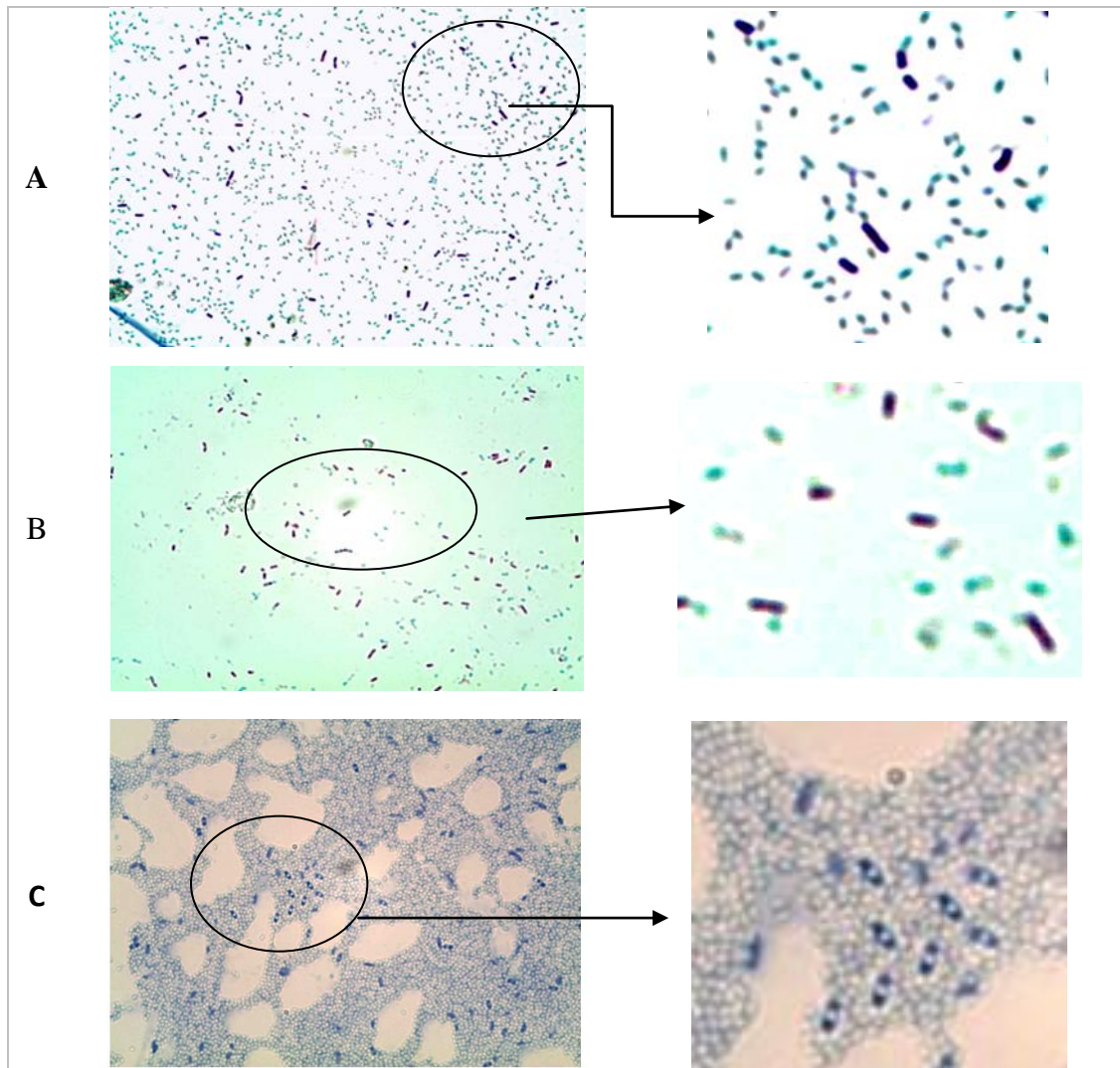


**Figure 11** : Aspect d'un isolat obtenu de la PLI-1 après une coloration de Gram (grossissement×1000, photo crédit personnel).

La majorité des isolats possèdent une spore ovale ou ronde non déformantes pour la cellule bactérienne, à l'état frais ces spores apparaissent brillantes et très réfringentes comme le montre la **Figure 12**, alors qu'elles apparaissent en vert après la coloration au vert de malachite (voir **Figure 13 A et B**) et incolore après la coloration de bleu de méthylène (**Figure 13 C**).



**Figure 12** : Observation microscopique des spores à l'état frais (Grossissement×1000, photos crédit personnel).

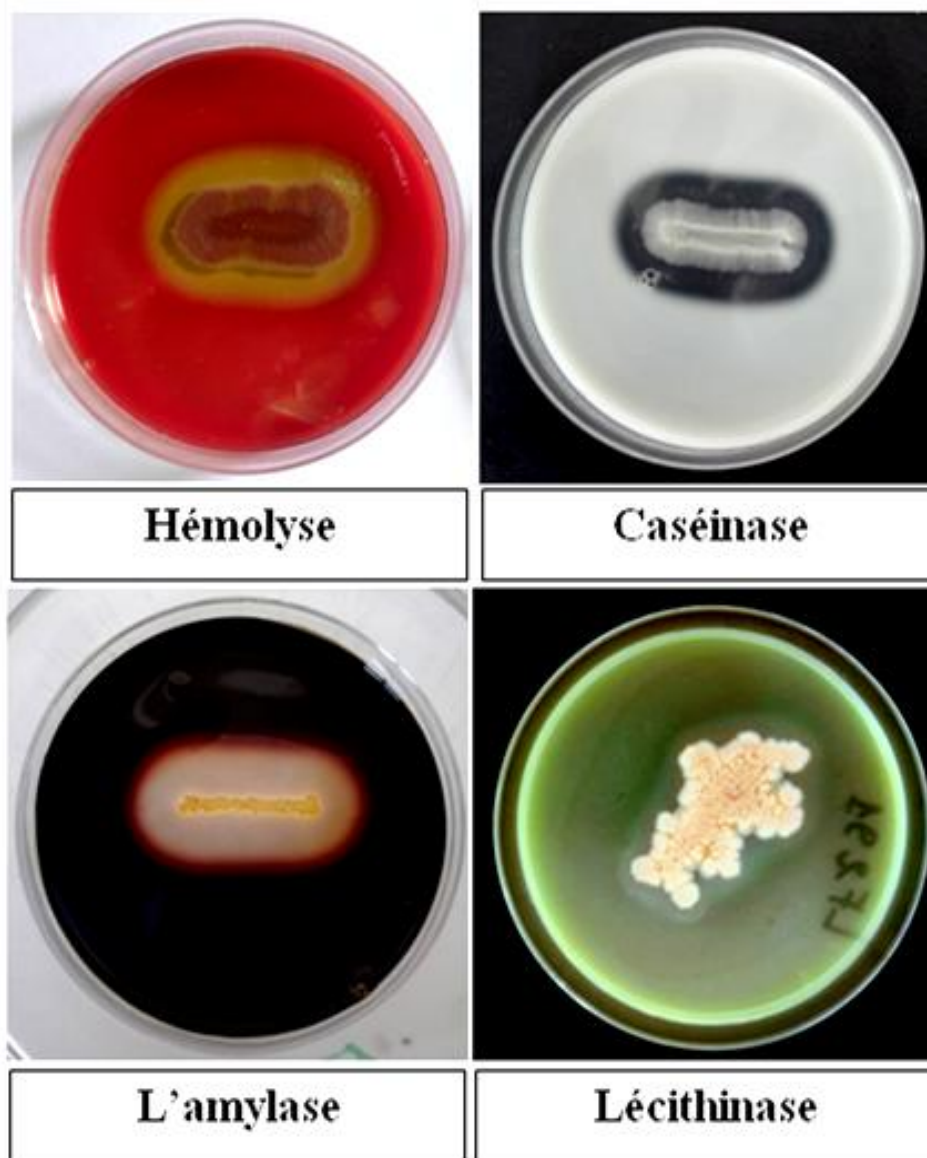


**Figure 13.** Aspect microscopique des spores d'un isolat obtenu de la PLI-2 après un examen à l'état frais (A), après coloration au vert de malachite (B) et après la coloration de bleu de méthylène (C). (Grossissement×1000, photos crédit personnel).



### I. 3.3. Mise en évidence des enzymes extracellulaires

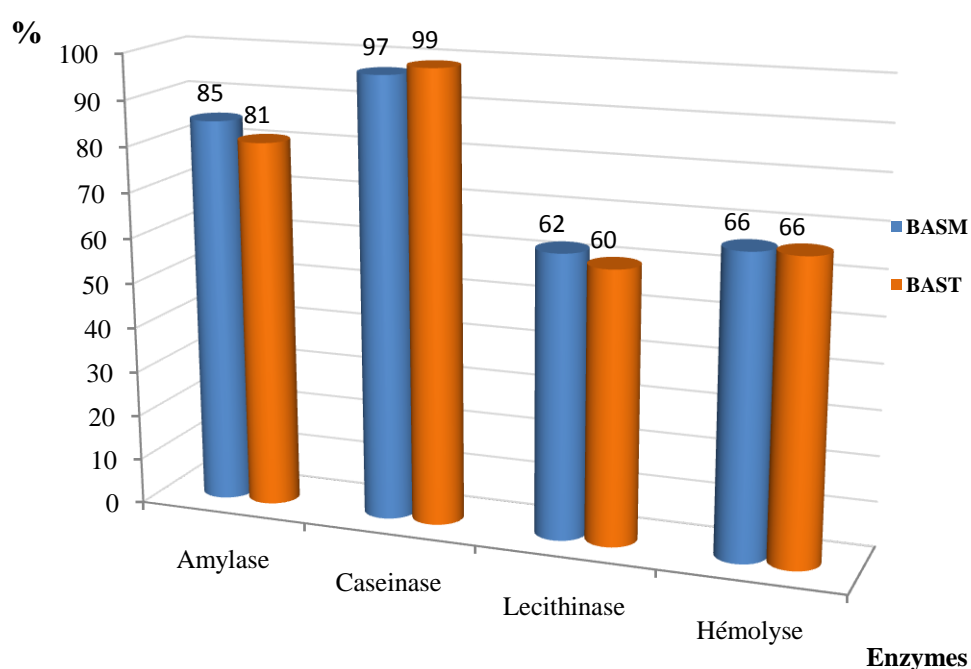
La recherche d'enzymes extracellulaires hydrolytiques sur des milieux sélectifs a révélé une production effective par les bactéries aérobies sporulées isolées des PLI testées, et ce pour toutes les enzymes extracellulaires recherchées (voir **Figure 14**).



**Figure 14** : Activité hydrolytique et hémolytique des isolats (photos crédit personnel).

Parmi les bactéries aérobies sporulées isolées des échantillons des trois marques de PLI, 85% des mésophiles et 81% des thermophiles ont hydrolysé l'amidon. Nous avons également enregistré 97% de mésophile et 99% de thermophile

avec une capacité de produire la protéase sur la gélose au lait. Du côté de l'activité lécithinase, 62% des mésophiles et 60% des thermophiles ont hydrolysé la lécithine. L'activité hémolytique a été mise en évidence chez 66% des bactéries sporulées mésophiles, ce même taux a été noté également chez les thermophiles (voir **Figure 15**). Par ailleurs, il a été constaté que 12% des isolats produisaient uniquement deux enzymes extracellulaires qui sont ; l'amylase et de la protéase, 24% produisaient les trois enzymes ; l'amylase, la protéase et la lécithinase, et 64% produisaient de l'amylase, la protéase, la lécithinase et l'hémolyse



**Figure 15** : Taux de production d'enzymes extracellulaires et l'hémolyse des isolats

**BAMS** : Bactéries aérobies sporulées mésophile – **BAST** : Bactéries aérobies sporulées Thermophile

Les bactéries aérobies sporulées sont présentes dans de nombreuses matières premières et ingrédients secs. Pour la chaîne de production laitière, l'environnement de la ferme et le lait cru contient jusqu'à plus de  $10^4$  ufc/ml. Ces matières sont considérées comme une importante sources de contamination potentielle par les bactéries sporulées des produits transformés (Lücking *et al.*, 2013) et ces bactéries aérobies sporulées, spécialement les *Bacillus* spp. sont connues par leur fort potentiel

hydrolytique extracellulaire (Sadiq *et al.*, 2018 ; Sadiq *et al.*, 2016 ; Hwang et Park, 2015 ; De Jonghe *et al.*, 2010).

En raison de la présence des bactéries aérobies sporulées dans le lait en poudre et surtout avec leurs potentiel d'altération, l'industrie laitière est constamment confrontée à un grand défi de risque d'altération voire sanitaire (Özdemir et Arslan, 2019; Hwang et Park, 2015 Lücking *et al.*, 2013). Cette préoccupation est mise en évidence par les résultats de cette étude qui montre que la majorité des isolats possédaient effectivement des activités amylasique, protéasique et lécithinolytique. La flore aérobie sporulée a été explorée dans beaucoup d'études précédentes, et a bien été isolée de lait cru, de lait en poudre, de PLI ainsi que de divers produits laitiers, cette flore exprime une activité enzymatique considérable (Zhuang *et al.*, 2019 ; Pei *et al.*, 2018; Sadiq *et al.*, 2016; Hwang et Park 2015; Lücking *et al.*, 2013; Di Pinto *et al.*, 2013).

Hwang et Park (2015) ont rapporté que les bactéries aérobies sporulées isolées à partir de la PLI présentaient une activité élevée de lécithinase, mais seulement 35% étaient positifs pour l'hydrolyse de l'amidon. L'enquête menée par Lücking *et al* (2013) a révélé que 50% des bactéries aérobies sporulées présentaient une activité protéolytique, par contre, la phospholipase a été observée uniquement chez les souches de *B. cereus*. Récemment, Özdemir et Arslan, (2019) ont trouvé que 69% des bactéries aérobies sporulées possédaient la lécithinase et 92% étaient positifs pour l'activité amylase.

Il est bien connu que les espèces de *Bacillus* ont une activité protéolytique extracellulaire plus élevée que toute autre bactérie (Sadiq *et al.*, 2018). Le genre *Bacillus* comprend des espèces qui jouent un rôle important dans les maladies d'origine alimentaire et la détérioration des aliments (Özdemir et Arslan, 2019). *Bacillus* spp. produisent une variété d'enzymes telles que l'amylase, la protéase, la lipase, la lécithinase (Özdemir et Arslan, 2019). Les souches de *B. licheniformis* ont montré un potentiel d'altération des produits laitiers par la production de plusieurs enzymes extracellulaires (Sadiq *et al.*, 2016).

D'autre part, l'activité hémolytique est un indicateur important des bactéries pathogènes, qui provoquent la lyse des globules rouges et indique ainsi un potentiel pathogène plutôt qu'une capacité d'altération (Sadiq *et al.*, 2016). De nombreuses bactéries aérobies sporulées isolés à partir de lait cru, de lait en poudre et de la PLI ont montré un potentiel hémolytique. Lücking *et al* (2013) ont constaté que 23% des

souches testées étaient hémolytiques. Hwang et Park (2015) ont rapporté que les souches de *Bacillus cereus* isolées à partir de la PLI présentaient un niveau d'hémolyse plus fort que les autres isolats, sachant que les membres du groupe *B. cereus* considérés comme une préoccupation majeure pour la sécurité sanitaire, car presque des souches isolées produisent fréquemment l'hémolysines (Sadiq *et al.*, 2016). Une autre enquête menée par Özdemir et Arslan (2019) a révélé qu'il y avait une activité hémolytique dans les membres du groupe *B. cereus*, du groupe *B. subtilis* et du groupe *Bacillus pumilus*. De plus, l'analyse réalisée par Sadiq *et al* (2016) a montré une activité hémolytique positive au sein du groupe *B. cereus*, des membres du groupe *B. subtilis* et des membres du groupe *Bacillus pumilus*. De Jonghe *et al* (2010) ont étudié la production des enzymes de détérioration qui affectent négativement la qualité du lait chez les espèces de *Bacillus*, les souches isolées étaient fortement protéolytiques et lipolytiques, mais l'activité de lécithinase semble être moins abondante.

## II. Identification des isolats

Au total 120 isolats de bactéries aérobies sporulées ont été caractérisés biochimiquement et confirmés par la technique MALDI-TOF MS.

### II. 1. Tests Biochimiques

Les tests d'identification biochimiques effectués ont révélé que 87% des isolats sont aéro-anaérobies facultatifs, 89% sont mobiles, 56% étaient mannitol positif et 80% avaient la capacité de réduire les nitrates en nitrites.

### II. 2. Identification des isolats par la technique MALDI-TP MS

La technique MALDI-TOF MS, basée sur l'appariement des empreintes de masses peptidiques où le spectre MS (spectrométrie de masse) des isolats microbiens inconnus est comparé aux spectres MS des isolats microbiens connus et contenus dans la base de données. Pour l'identification d'espèces, une plage de masse spécifique  $m/z$  de 2 à 20 kDa est utilisée, celle-ci représente principalement des protéines ribosomales avec quelques protéines de fonctions ménagères (Singhal *et al.*, 2015). Les résultats de cette identification qui sont présentés dans le **Tableau 8** ont révélé que *Bacillus licheniformis* était *Bacillus* spp.le plus abondant dans les PLI, avec une incidence de 54% (65/120) suivi par *Bacillus cereus* avec 33,3% (40/120), *Bacillus subtilis* 5% (06/120), et pour chacun de *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus*

*pumilus* 1.6% (02/120). Aussi, 0.8% (01/120) a été enregistré pour chacun des *Bacillus indicus*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus sonorensis*, *Paenibacillus latus* et *Lysinibacillus sphaericus* (Tableau 9).

Parmi les espèces identifiées, 17.5% (07/40) de *B. cereus* et 35% (23/65) de *B. licheniformis* identifiés étaient thermophiles. La contamination la plus élevée dans toutes les marques étudiées a été détectée dans les échantillons de la PLI de 2<sup>ème</sup> âge, où le nombre de souches isolées était supérieur au nombre isolé de la PLI de 1<sup>er</sup> âge, notamment *B. licheniformis*, *B. cereus* et *B. subtilis*.

**Table 8:** Identification des bactéries aérobies sporulées isolées de trois marques de PLI commercialisées en Algérie

Code	Espèces	Marque	Age de PLI	Code	Espèces	Brand	Age de PLI
LF263	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 2	C296	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 2
L171	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1	L111	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
LF261	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	L124	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
LF146	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1	L256	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
LF235	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	LF233	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF262	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 2	L212	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
LF232	<i>Paenibacilluslatus</i>	PLI-1	Age 2	L133	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1
L123	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	C172	<i>Bacillus pumilus</i>	PLI-2	Age 1
L287	<i>Bacillus pumilus</i>	PLI-3	Age 2	L136	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
L132	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1	LF285	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
C162	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1	C231	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 2
L162	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	C272	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
LF223	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-1	Age 2	LF218	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
C152	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1	C121	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1
L121	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1	C232	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
C291	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 2	LF242	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF183	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1	L122	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
L116	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1	L275	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
LF227	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	L114	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1
L284	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2	C265	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
L296	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2	C234	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 2
L192	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	L258	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
C195	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-2	Age 1	L153	<i>Bacillus atrophaeus</i>	PLI-3	Age 1
LF173	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 1	LF165	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PLI-1	Age 1
C156	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 1	L172	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1
C211	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 2	C293	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
LF215	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 2	C165	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1
L262	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2	C215	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-2	Age 2
LF194	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1	L161	<i>Bacillus indicus</i>	PLI-3	Age 1
C274	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2	L115	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
LF156	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 1	LF125	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1
LF175	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 1	L142	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
LF291	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	LF294	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF167	<i>Lysinibacillusphaericus</i>	PLI-1	Age 1	C273	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
LF219	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	C126	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1
L244	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2	C163	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1
LF181	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1	LF273	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
L243	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2	C192	<i>Bacillus sonorensis</i>	PLI-2	Age 1
L197	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-3	Age 1	L233	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
LF234	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-1	Age 2	L245	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
C175	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 1	L291	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
C213	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2	L257	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2



L224	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2	LF158	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1
L135	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1	LF297	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
C285	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2	LF131	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1
L221	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2	L145	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
L154	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	LF293	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF296	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	L251	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
LF111	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 1	L261	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 2
C157	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	PLI-2	Age 1	C111	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1
C141	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1	L274	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2
L173	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	LF292	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF287	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	C222	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
L225	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 2	LF124	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 1
C293	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2	LF272	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2
LF245	<i>Bacillus subtilis</i>	PLI-1	Age 2	L137	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-3	Age 1
C255	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2	LF192	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 1
C151	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-2	Age 1	C235	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-2	Age 2
L164	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1	L151	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-3	Age 1
LF282	<i>Bacillus licheniformis</i>	PLI-1	Age 2	LF253	<i>Bacillus cereus</i>	PLI-1	Age 2

**Tableau 9:** L'incidence des bactéries aérobies sporulées mésophiles et les bactéries aérobies sporulées thermophiles dans la PLI par rapport à l'âge et la marque.

Espèces	n			% par âge de PLI		% par marque		
	Isolats (%)	BASM	BAST	1 <sup>er</sup> âge	2 <sup>ème</sup> âge	PLI-1	PLI-2	PLI-3
						1	2	3
<i>B. licheniformis</i>	65 (54.2)	42	23	46.0	54.0	40.0	21.5	38.5
<i>B. cereus</i>	40 (33.3)	33	7	42.5	57.5	22.5	35.0	42.5
<i>B. subtilis</i>	6 (5.0)	6	0	33.3	66.7	50.0	33.3	16.6
<i>B. amyloliquefaciens</i>	2 (1.6)	2	0	100	00	50.0	50	00
<i>B. pumilus</i>	2 (1.6)	1	1	50	50	00	50	50
<i>P. latus</i>	1 (0.8)	1	0	00	100	100	00	00
<i>L. sphaericus</i>	1 (0.8)	1	0	100	00	100	00	00
<i>B. atrophaeus</i>	1 (0.8)	1	0	100	00	00	00	100
<i>B. indicus</i>	1 (0.8)	1	0	100	00	00	00	100
<i>B. sonorensis</i>	1 (0.8)	0	1	100	00	00	100	00
<b>Total</b>	<b>120</b>	<b>88</b>	<b>32</b>					

Il est intéressant de noter que *B. cereus* a été détecté dans 54% (29/54) d'échantillons analysés avec une moyenne de 2,6 log<sub>10</sub> spore/g, et la plage variait de 1 à <3 log<sub>10</sub> spore/g, et sa fréquence d'apparition était de 22,5%, 35% et 42,5% pour les marques PLI-1, PLI-2 et PLI-3 respectivement. De plus, *Paenibacillus latus* et *Lysinibacillus sphaericus* sont apparus que dans la marque PLI-1, où la charge la plus grande de *B. cereus* a été enregistrée, accompagné de charge également élevées de la FMAT dépassant 4 log<sub>10</sub> ufc/g. Il est très intéressant de noter que PLI-3 comprenait les échantillons les moins contaminés, cependant la fréquence d'apparition de *B. cereus* détectée est la plus élevée.

Les principales bactéries sporulées présentes dans la PLI appartiennent au genre *Bacillus* (Sadek *et al.*, 2018; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1994), parmi les quelles il y a des mésophiles (Burgess *et al.*, 2010) et des thermophiles (Watterson *et al.*, 2014) qui sont à l'origine de l'inquiétude de l'industrie laitière (Zhao *et al.*, 2020; Zhuang *et al.*, 2019 ; Pereira et Sant'Ana., 2018; Anvarian *et al.*, 2016 ;Peña *et al.*, 2014). *Bacillus* sont souvent associés à la détérioration et à la production de spores thermorésistantes (Pereira et Sant'Ana., 2018; Lücking *et al.*, 2013). C'est un genre qui est connu pour sa grande diversité phénotypique et génotypique (Özdemir et Arslan, 2019; Heyndrickx, 2011; From *et al.*, 2005; Peña *et al.*, 2014). Il contient également des espèces qui jouent un rôle important dans les maladies d'origine alimentaire. (Pia *et al.*, 2019; Pereira *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2018; Munford *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2016; Hwang et Park., 2015; Checinska *et al.*, 2015; De Jonghe *et al.*, 2010).

Dans cette étude, les bactéries aérobies sporulées isolées à partir de la PLI sont dotées d'une grande hétérogénéité et d'une grande diversité génotypique, marquée par une forte présence de *B. licheniformis* suivi de *B. cereus*, notamment avec l'apparition de *Paenibacillus latus* et *Lysinibacillus sphaericus*.

En accord avec d'autres études, la même diversité d'espèces a été signalée dans les échantillons de la PLI et *Bacillus licheniformis* s'est avéré être l'espèce les plus répandus (Sadiq *et al.*, 2016; Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997).

À l'instar des études précédentes, le niveau moyen de contamination de *B. cereus* dans les échantillons de la PLI était inférieur à 3 log<sub>10</sub> spores/g, et la prévalence dans les échantillons variait de 17 à 59% (Pei *et al.*, 2018; Sadek *et al.*, 2018; Hwang et Park, 2015; Di Pinto *et al.*, 2013; Haughton *et al.*, 2010; Reyes *et al.*, 2007; Rowan *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1994). Le fait que *B. cereus* semble être principalement isolé de l'environnement de transformation plutôt que des matières premières (Wu *et al.*, 2018; Zhuang *et al.*, 2019), il est suggéré que *B. cereus* devrait faire l'objet d'une surveillance intensive et pourrait être un indicateur de sécurité microbiologique approprié dans la PLI (Yang *et al.*, 2017; Di Pinto *et al.*, 2013).

Une étude récente menée par Pei *et al* (2018), ou 6656 d'échantillons de PLI ont été analysés, a révélé que la prévalence de *B. cereus* était <10 ufc/g pour 92,4% des échantillons, ≥ 10 ufc/g pour 7,5% des échantillons et 1,1% était supérieure à 100 ufc/ g, et la charge la plus élevée de *B. cereus* était de 3,7 log<sub>10</sub> ufc/ g.

Les laits infantiles en poudres doivent être traités uniquement par des procédés physiques et doivent être conditionnés de manière à prévenir toute dégradation et contamination, et le traitement thermique est une étape cruciale pour assurer la sécurité sanitaire du produit (CAC, 2008).

Les spores de *B. cereus* peuvent survivre au traitement thermique de la pasteurisation (Dréan *et al.*, 2015, Di Pinto *et al.*, 2013; Haughton *et al.*, 2010 ; Gaillard *et al.*, 1998; Becker *et al.*, 1994) , et selon Stadhouders *et al* (1982), il faut 10 – 20 s à 125°C pour inactiver toutes les spores de *B. cereus* dans le lait, alors que dans le processus de fabrication de la LIP, ils procèdent avec les étapes suivantes : traitement thermique à 88–95 °C, pendant 15–30 s, concentration par évaporation et séchage par pulvérisation. Probablement c'est la raison pour laquelle lait déshydraté, y compris les préparations pour nourrissons, ont été fréquemment observés d'être contaminées par les spores *B. cereus*. La contamination de la PLI par *B. cereus* est inévitable, compte tenu des technologies de fabrications actuelles (Zhuang *et al.*, 2019 ; Wu *et al.*, 2018), mais leurs taux peuvent être réduits si une analyse des risques et un système de contrôle de points critique HACCP est mis en œuvre pendant la fabrication (Di Pinto *et al.*, 2013 ;Haughton *et al.*, 2010 ;Becker *et al.*, 1994).

L'enquête menée par Wu *et al* (2018) analysant l'air de l'usine de PLI, a montré que *Bacillus* spp. représentaient 35% de la communauté bactérienne dominante, où *B. licheniformis* et *B. cereus* occupaient respectivement 12,9% et 7,2%. *B. cereus* était l'un des agents pathogènes principalement trouvés dans le remplissage de grands sacs, le remplissage de boîtes et les emballages.

D'autre part, Zhuang *et al* (2019) ont constaté que seuls 4 sur 84 *B. cereus* étaient isolés des matières premières, et que les autres souches ont été isolées à partir de l'environnement de traitement, indiquant que la contamination des matières premières était inférieure à celle des environnements de traitement. Ils a été suggéré que *B. cereus* devrait faire l'objet d'une surveillance et d'un contrôle intensifs, ce qui pourrait être un indicateur de sécurité microbiologique approprié dans la PLI (Zhao *et al.*, 2020; Vidic *et al.*, 2020; Zhuang *et al.*, 2019; Pei *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017).

Les travaux de Scott *et al* (2007) situent l'origine de la contamination du lait en poudre par des bactéries sporulées au niveau des échangeurs de préchauffage du lait et de l'évaporateur. Il a été découvert que des isolats de *B. cereus* ont été surtout décelés dans les préparations pour nourrissons avec d'autres espèces thermophiles sporulées

telles que : *B. licheniformis* et *Geobacillus stearothermophilus* (Sadiq *et al.*, 2016 ; Haughton *et al.*, 2010 ; Becker *et al.*, 1994). *B. licheniformis* a été trouvée dans le lait cru et le lait infantile en poudre, et elle est également impliqués dans des cas d'intoxication alimentaire (Logan, 2012 ;From *et al.*, 2007 ;From *et al.* ., 2005; Rowan *et al.*, 2003; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999; Kramer et Gilbert, 1989 ). Dans une étude de large investigation réalisée par Becker *et al* (1994) en analysant 261 échantillons de 17 pays, il a été constaté qu'en 1992, 70% des laits infantiles en poudre en Allemagne été positives pour *B. cereus*, à des niveaux allant jusqu'à  $6 \times 10^2$  spore/g, par contre dans leur étude similaire en 1982/1983, seulement 31% étaient positifs, les mêmes auteurs ont soulignés que les préparations pour nourrissons sont naturellement contaminées par des charge de *B. cereus* d'environ  $10^2$  spore/g et peuvent atteindre des niveaux de  $10^5$  *B. cereus*/g lorsque la poudre de lait est reconstituée et incubée à température ambiante pendant 7-9 h. Rowan et Anderson (1997) ont constaté la croissance de *B. cereus* dans 63 parmi les 100 échantillons de lait infantiles reconstituées en 14 h à 25°C. Plusieurs souches de *B. cereus* originaires de lait pour nourrissons ont été révélés comme des productrices de cereulide (Andersson *et al.*, 2004; Ehling-Schulz *et al.*, 2005). Selon Organji *et al* (2015), des cas de diarrhée infantile étaient souvent causés par la consommation de PLI contaminé par *B. cereus*.

Dans cette recherche, l'analyse a montré que 18.5% des échantillons étudiés dépassaient la limite maximale de 2,7 log<sub>10</sub> ufc/g recommandée par la réglementation algérienne des critères microbiologiques applicables à *B. cereus* pour la PLI (JORA, 2017). La PLI est un produit destiné à un groupe de consommateurs potentiellement sensibles et fragiles, donc la présence *B. cereus* dans cet aliment représente un risque de maladie (Vidic *et al.*, 2020; Pei *et al.*, 2018; Di Pinto *et al.*, 2013; Reyes *et al.*, 2007 ; Becker *et al.*, 1994). Des cas de méningo-encéphalite hémorragique sévère chez des nourrissons prématurés ont été décrits au cours d'une infection à *B. cereus* (Lequin *et al.*, 2005). De plus, un autre cas a été observé chez un nouveau né, concernant une méningo-encéphalite inhabituel causée par *B. cereus* (Manickam *et al.*, 2008). *B. cereus* est l'espèce la plus importante pour la sécurité des produits laitiers en poudre (Reyes *et al.*, 2007).

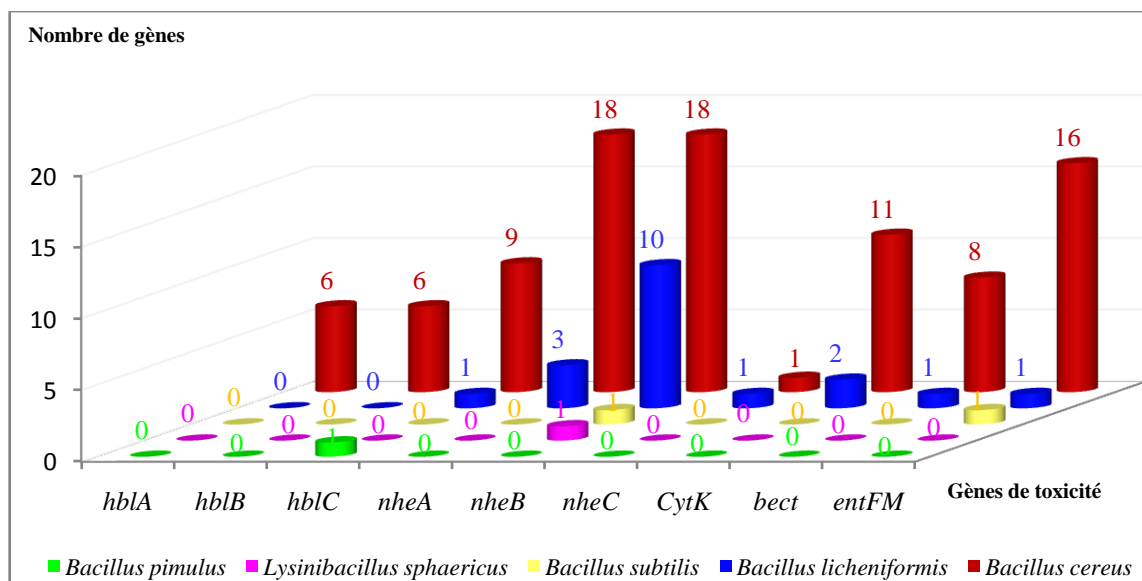
D'une autre part, il y a des études qui ont affirmé que le stockage prolongé de la PLI reconstitué a conduit à l'émergence de *B. cereus* en tant qu'organisme dominant,

poussant souvent à l'exclusion des autres espèces de *Bacillus* spp. (Haughton *et al.*, 2010; Rowan *et al.*, 1997). De plus, la détection de *B. licheniformis* et *B. subtilis* soulève d'importants problèmes de santé concernant *Bacillus* spp. dans la PLI (Di Pinto *et al.*, 2013), et surtout qu'ils sont abondamment présents dans le lait cru, et capables de produire des toxines (Logan, 2012; From *et al.*, 2005; Rowan *et al.*, 2001) et des enzymes d'altération (Özdemir et Arslan, 2019 ; Sadiq *et al.*, 2016; Hwang et Park, 2015; Lücking *et al.*, 2013; De Jonghe *et al.*, 2010), y compris certains des thermophiles facultatifs comme *B. licheniformis*, *B. pumilis* et *B. subtilis* (Logan, 2012 ; De Jonghe *et al.*, 2010).

Le sol est riche en *Bacillus* spp. et les spores de *Bacillus* peuvent facilement contaminer l'environnement, les ustensiles et le matériel utilisés lors de la traite, alors la contamination du lait cru par ces bactéries devient inévitable. Ainsi, l'application de bonnes pratiques de fabrication tout au long du traitement des matières premières est essentielle pour contrôler l'apparition et la concentration des spores dans le produit final (Pereira et Sant'Ana, 2018). D'un point de vue économique, la présence de spores associée à une conservation des aliments imparfaites peut entraîner de grandes pertes économiques. (Lücking *et al.*, 2013; De Jonghe *et al.*, 2010), pour cela, il est important d'identifier les spores présentes dans les poudres de lait en général, afin que des approches préventives puissent être développées. (Miller *et al.*, 2015).

### **III. Recherche des gènes de toxicité**

La recherche des gènes de toxicité au sein des souches isolées a révélé que certains membres du groupe *Bacillus cereus*, du groupe *Bacillus subtilis* et une souche de *Lysinibacillus sphaericus* contiennent des gènes d'entérotoxines diarrhéiques qui sont associés à l'intoxication alimentaire. Les détails du résultat des gènes de toxicité détectés pour chaque souche sont présentés dans la **Figure 16**.



**Figure 16 :** Nombre de gènes de toxicité détectés pour chaque espèce

La détection des gènes de toxines par la PCR a révélé que 36.6% (44/120) des isolats hébergeaient au moins un gène, et les taux de présence de ces gènes de toxicité dans les espèces isolées étaient 56.8% (25/44), 34% (15/44), 4.5% (02/44), 2.3% (01/44) et 2.3% (01/44) pour *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus* et *L. sphaericus* respectivement. Le plus grand nombre de souches hébergeant des gènes de toxicités a été observé dans la marque PLI-1, et comme on a déjà mentionné dans la section précédente, c'est la marque qui contient la plus forte charge de FMAT et de spores.

Il a été rapporté que certaines souches peuvent provoquer une intoxication avec seulement 1 ou 2 gènes parmi les gènes des composants hbl ou nhe (Ngamwongsatit *et al.*, 2008). Par conséquent, l'existence de l'un des gènes des composants *hblC*, *hblD* et *hblB* codant pour le composant lytique L2, L1 et le composant de liaison B de la toxine *HBL* a été considérée comme positive pour *hbl*. La même chose pour la présence de l'un des gènes composants ; *nheA*, *nheB* et *nheC* codant pour la toxine *NHE*, a été également considérée comme positive pour *nhe* (Hwang et Park, 2015).

En ce qui concerne *B. cereus*, toutes les souches hébergeaient au moins un composant du gène *nhe*, et les taux de *nheA*, *nheB* et *nheC* été respectivement de 72, 72 et 4%. En revanche, seulement 28% des souches abritaient au moins un composant du gène *hbl* et, où les taux de *hblA*, *hblB* et *hblC* étaient respectivement de 24, 24 et 28%. Le complexe de gènes *hblABC* a également été détecté dans 15% des souches. D'autre part, 44% des *B. cereus* positifs pour le *cytK*, 32% abritaient le *bceT* et 64%

hébergeait l'*entFM*. De plus, 28% des souches de *B. cereus* avaient 6 à 7 gènes de toxicité, 44% 2 à 4 gènes et 28% avec un gène. D'un autre côté, 56% de ces souches de *B. cereus* ont été isolées à partir de la PLI de 2<sup>ème</sup> âge.

Dans cette étude, 68 souches appartiennent au groupe *B. subtilis* ont été isolées; parmi lesquelles 17.6% (12/68) de *B. licheniformis* positifs pour *nhe*, et les taux de *nheA*, *nheB* et *nheC* été de 4.6%, 15.4% et 1.5% respectivement. De plus, nous avons détecté 3% (02/68) *B. licheniformis* contenant *hbl* et *cytK*, et 1.5% (01/68) était positif pour les gènes *bcet* et *entFM*. D'un autre côté, trois souches de *B. licheniformis* hébergeaient entre 2-3 gènes, la première contenait tous les complexe *nheABC*, la deuxième avait les gènes *nheA*, *cytK* et *entFM*, et la troisième comprenait *hblC* et *cytK*. Pour ce qui est de *B. subtilis*, une souche 1.5% (01/68) été positive pour *nheB* et l'autre 1.5% (01/68) pour *entFM*. Egalement pour *B. pumilus* 1.5% (01/68) du était positif pour *hbl*, et une souche de *L. sphaericus* 1.5% (01/68) été positive pour *nheB*.

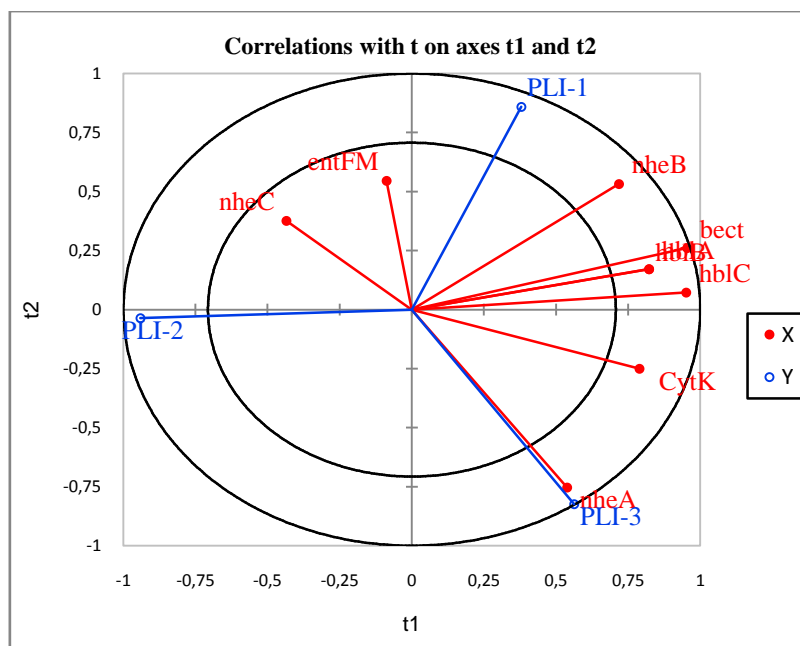
### III. 1. Analyse discriminante par les moindres carrés partiels (PLSDA)

Afin d'évaluer la cohérence de ces résultats, une analyse multi-variée et discriminatoire qui est la régression des moindres carrés partiels (PLS-DA) a été utilisée pour mesurer les relations intrinsèques entre les marques d'échantillons étudiés et la distribution des gènes de toxines à l'intérieur de chaque marque. C'est une méthode d'étalonnage multivariée qui utilise un modèle prédictif des moindres carrés partiels à deux blocs pour modéliser la relation entre deux matrices X et Y (Granato *et al.*, 2018).

Le PLS-DA généré a abouti à un modèle à 2 composants, avec  $Q^2 = 0,638$ ,  $R^2Y = 0,921$  et  $R^2X = 0,697$ , suggérant l'explication de 92,1% des variables indépendantes et 69,7% de l'explication des variables dépendantes (marques de préparations pour nourrissons et gènes de toxine, respectivement) (**Figure 17**). En outre, une efficacité de 100% aux étapes de classification et de régression a été obtenue, suggérant un modèle sûr. Comme  $R^2X$  et  $R^2Y$  sont  $\geq 0,700$  et les valeurs  $Q^2$  sont  $\geq 0,500$ , il devient clair qu'il y a une capacité de prédiction du modèle de régression (Martins *et al.*, 2017).

Les modèles générés ici (**Figure 17**) par le PLS-DA sont adéquats, indiquant ainsi que la présence de gènes de toxine et donne des informations capables de différencier les différentes marques de la PLI, ce qui a permis également de vérifier la relation entre les différentes marques ainsi que de définir des groupes de gènes de toxines.





**Figure 17:** Distribution des gènes au sein des différentes marques de PLI

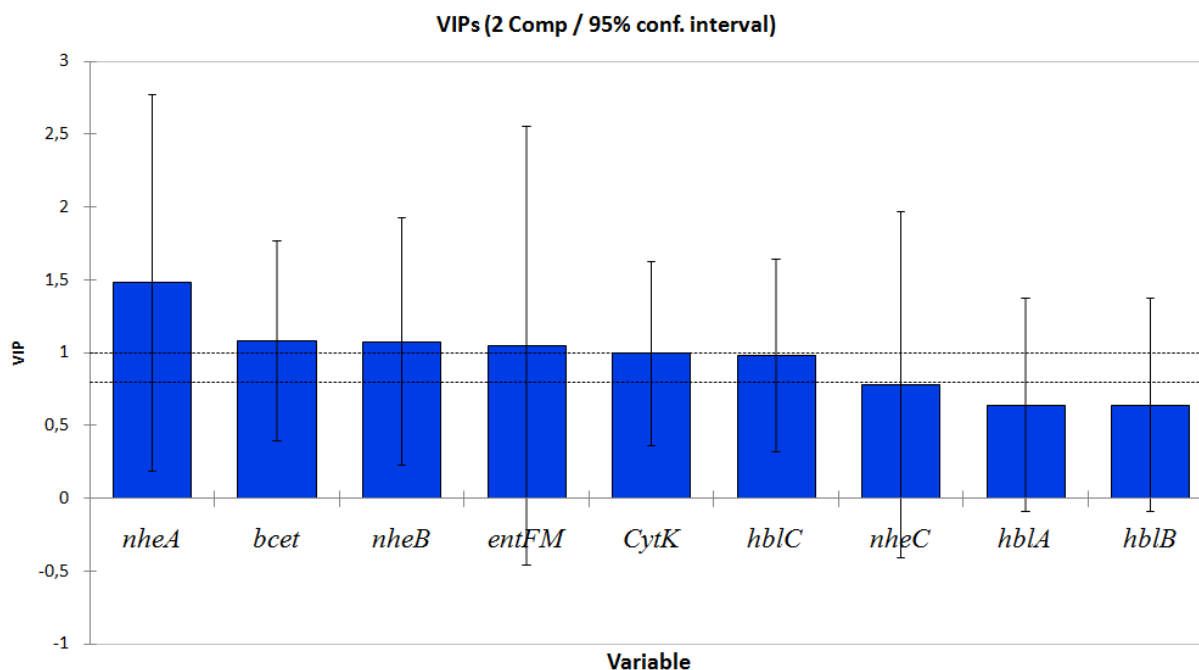
Le résultat de la PLS-DA présenté dans la **Figure 17** indique une séparation statistiquement significative entre les trois marques de PLI, ainsi que les gènes de toxine appartenant pour chaque marque ( $p < 0.05$ ). Les marques se distinguent bien les unes des autres, par la formation de groupes spécifiques de gènes qui ont de fortes corrélations positives au sein de chaque groupe.

Le premier groupe de gènes de toxine ; *hblA*, *hblB*, *hblC*, *dheB* et *bect* sont corrélés avec la marque PLI-1. Le deuxième groupe ; *dheA* et *CytK* sont corrélés avec la marque PLI-3. Le dernier groupe ; *entFM* et *dheC* ne semblent être en corrélation avec aucune marque. De plus, aucun gène de toxine n'est corrélé avec la marque PLI-2.

On peut dire aussi que les souches isolées, diffèrent d'une marque à l'autre en fonction des gènes de toxicités qu'elles hébergent, et les gènes de toxine sont très différemment répartis d'une marque à l'autre.

La **Figure 18** affiche les VIP (variable importance projection), elle représente la mesure de l'importance d'une variable dans le modèle PLS-DA utilisé dans cette recherche.





**Figure 18:** Les scores de projection (VIP) des gènes de toxicité étudiés

Les facteurs (les gènes de toxicité) ayant une importance variable élevée dans les scores de projection (VIP) sont considérés comme significatifs et, par conséquent, pris en compte pour l'analyse quantitative de la variation.

À partir des résultats fournis par PLS-DA, l'importance variable dans la projection (score VIP) peut être obtenue. Les scores VIP supérieurs à 1,0 sont acceptables et sont extrêmement importants et mettent en évidence les paramètres responsables de la discrimination des échantillons (Rossini *et al.*, 2012). L'utilisation de l'outil de score VIP dans l'industrie est due à sa capacité à gérer un grand nombre de variables de produit et de réponse, ainsi que des données de bruit élevé, une colinéarité et des observations incomplètes (Kourti et Macgregor, 1995). Les gènes de toxine *nheA*, *bect*, *nheA* et *entFM* présentaient des valeurs VIP de 1,480, 1,081, 1,075 et 1,049 et peuvent être considérés comme responsables de la discrimination des préparations pour nourrissons.

Dans le présent travail, la recherche des gènes de toxines a révélé que de nombreux *Bacillus* spp. isolés de la PLI abritaient un potentiel de virulence considérable en tant qu'agents pathogènes, ce qui peut provoquer une maladie grave chez les nourrissons, sachant que le système immunitaire à cet âge développe ses premières étapes de son installation. La préoccupation de plusieurs espèces de *Bacillus* en dehors du groupe *B. cereus* est imminente et peut provoquer une intoxication

alimentaire; surtout que la présence de gènes de toxines et la production d'entérotoxines aux seins de groupe *B. subtilis* et le groupe *B. circulans* ont été signalés dans de nombreuses études précédentes (Ozdemir et Arslan 2019; Ouoba *et al.*, 2008; Rowan *et al.*, 2001).

Des rapports antérieurs ont montré que les souches de *B. cereus* isolées à partir de la PLI, d'aliments pour nourrissons et d'autres produits alimentaires, abritant des gènes de toxines, la cause principale des maladies émétiques et diarrhéiques d'origine alimentaire, (Zhao *et al.*, 2020; Hwang et Park 2015; Guinebretière *et al.*, 2002) et considéré aussi comme un producteur potentiel de toxines (Di Pinto *et al.*, 2013).

En comparant nos résultats avec les données de la littérature, on peut conclure que les taux de gènes de toxines étaient comparables, bien que certaines valeurs soient légèrement différentes de celles rapportées par d'autres auteurs. En accord avec d'autres rapports, il semble que presque toutes les souches de *B. cereus* portent des gènes *nhe*, et les taux que nous avons obtenus pour *hbl*, *cytK*, *bceT* et *entFM*, se situaient dans la fourchette rapportée par d'autres auteurs (Zhao *et al.*, 2020 ; Sadek *et al.*, 2018; Hwang et Park, 2015; Di Pinto *et al.*, 2013; Molva *et al.*, 2009; Ngamwongsatit *et al.* 2008; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008; Ouoba *et al.*, 2008; Minnaard *et al.*, 2007; Guinebretière *et al.*, 2002). De plus, en concordance avec d'autres investigations, le groupe *B. subtilis* (Ozdemir et Arslan, 2019; Ouoba *et al.*, 2008; Rowan *et al.*, 2001) et *B. sphaericus* (actuellement *Lysinibacillus sphaericus*) (Rowan *et al.*, 2001) portaient des gènes d'entérotoxines diarrhéiques tels que *nhe*, *hbl*, *bcet* et *CytK*, sachant que *hbl*, *nhe* et *cytK* sont les principaux facteurs de virulence dans la maladie diarrhéique d'origine alimentaire de *B. cereus* (Kovac *et al.*, 2016; Stenfors Arnesen *et al.*, 2008, Guinebretière *et al.*, 2002).

Un article publié par Di Pinto *et al* (2013) a montré que toutes les souches de *B. cereus* isolées à partir de la PLI abritaient au moins un gène de toxine. Pour les gènes *nheA*, *nheB* et *nheC*, les taux étaient de 83.3%, 91.6% et 58.3% respectivement. Du côté de *hblA*, *hblB* et *hblC*, les chercheurs ont rapporté respectivement 58 %, 50% et 41.6%, en plus, la totalité des souches isolées contenaient le gène *cytK*.

Selon l'article de Hwang et Park (2015) les souches de *B. cereus* isolées de la PLI abritaient *hbl*, *nhe*, *cytK*, *bcet* et *entFM* avec des taux de 30%, 99%, 20%, 36% et 94% respectivement. Les auteurs de ce travail ont déduit que 14% de la souche de *B. cereus* possédait 5 gènes.

Dans un travail récent, Sadek *et al* (2018) ont étudié une variété d'aliments pour nourrissons et ils ont révélé que les taux de gènes de toxines impliqués dans les isolats de *B. cereus* variaient entre 7% à 50% pour *hblA*, 71% à 83% pour *nheC* et 75% à 100% pour *cytK*. Cependant, aucun gène de toxine n'a été détecté dans les isolats des échantillons de la PLI.

Plus récemment, un travail similaire mené par Zhao *et al* (2020), a révélé que toutes les souches de *B. cereus* isolé de la PLI hébergeaient le complexe *nheABC* et *bceT*. D'autre part, les taux de *hblA*, *hblC*, *cytK* et *entFM* étaient de 85.7%, 71.4%, 71.4% et 85.7% respectivement.

En effet, l'expression des gènes de toxines semble jouer un rôle majeur dans la détermination du potentiel pathogène d'une souche particulière (Stenfors Arnesen *et al.*, 2008), et même si *B. cereus* est fréquente dans le lait et les produits laitiers, l'intoxication par *B. cereus* est rarement signalée, probablement parce que le lait ne convient pas à la production de toxines (Becker *et al.*, 1994; Reyes *et al.*, 2007).

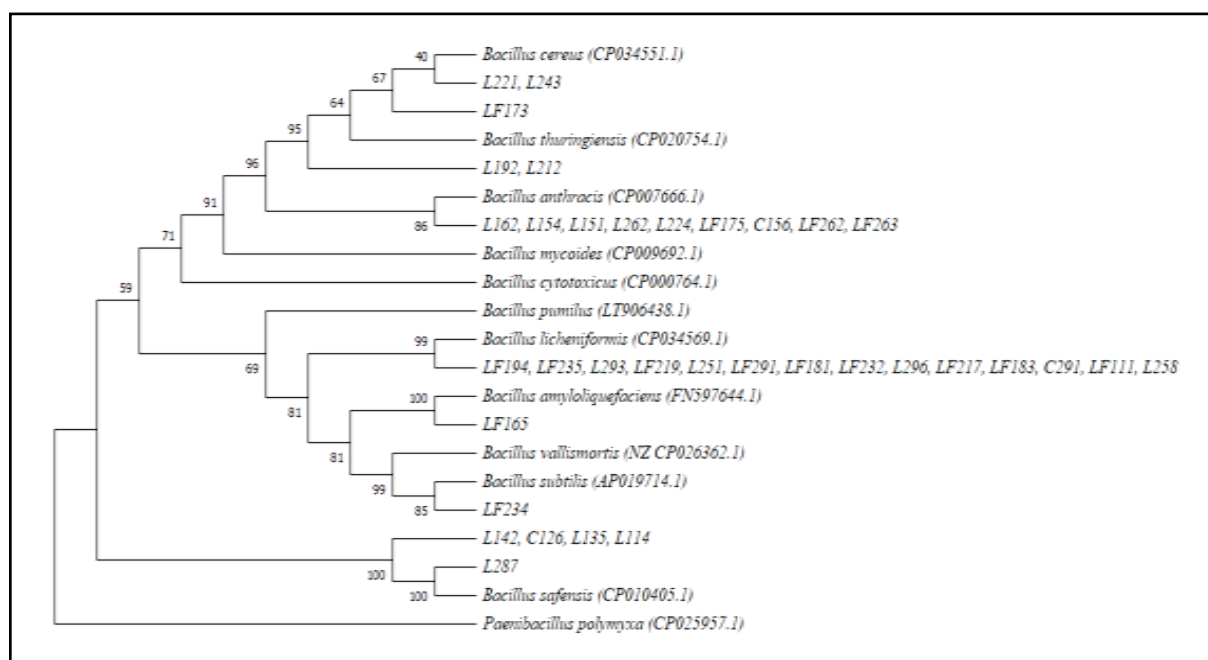
Malgré l'intoxication alimentaire causée par *Bacillus* spp. telle que *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus*, ces dernières restent peu étudiées, et surtout qu'un certain nombre de rapports impliquent à la fois des souches de *B. subtilis* et *B. licheniformis* comme agents potentiels d'intoxication alimentaire ont été publiés (Logan, 2012). À cet égard, Ozdemir et Arslan (2019) ont détecté qu'une souche de *B. licheniformis* abritait les gènes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB* et *nheC*, et une autre souche de *B. firmus* portait les gènes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheB*, *nheC*. Une autre étude a rapportée que deux isolats de *B. subtilis* et un autre isolat de *B. licheniformis* abritaient des gènes *hbl* et *cytK* (Ouoba *et al.*, 2008). Rowan et ses collaborateurs (2001), ont rapportés que les espèces de *Bacillus* spp. abritaient des gènes tels que *bceT*, *hblA*, *hblC* et *hblD*, et certaines souches ont exprimé les gènes de toxine après une croissance dans la PLI reconstitué.

Il a été démontré que *B. licheniformis* (From *et al.*, 2005; Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999), *B. pumilus*, *B. subtilis* (From *et al.*, 2005), ont la capacité à produire de nouvelles toxines thermostables, similaires aux caractéristiques physico-chimiques de la cereulide. De plus, parmi les isolats toxiques de *B. licheniformis*, des ribotypes toxigènes différents ont été isolés du même lot d'aliments pour bébés (Salkinoja-Salonen *et al.*, 1999), et des substances cytotoxiques thermolabiles ont été détectées parmi les souches de *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* et *B. pumilus*, également, un composant cytotoxique thermostable autre que la toxine émétique a été produit par

*B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* (De Jonghe *et al.*, 2010). Un décès d'un enfant a été causé par *B. licheniformis*, qui a été lié aux préparations pour nourrissons. La lichénysine A de *B. licheniformis*, qui est un lipopeptide cyclique thermostable, était impliquée (Logan, 2012). En revanche, les souches de *B. licheniformis* et *B. subtilis* peuvent produire de la surfactine, un surfactant très puissant présentant une similitude structurelle avec la lichénysine A et la cereulide (Logan, 2012).

#### IV. Typage moléculaire par le séquençage du gène *rpoB*

La diversité de la flore aérobie sporulée des échantillons de la PLI a été évaluée à l'aide du typage moléculaire par le séquençage du gène *rpoB*. Pour cela, 35 souche de *Bacillus* spp. isolées de la PLI ont subi ces analyses moléculaires. L'arbre phylogénétique représenté sur la **Figure 19** a été généré à partir des séquences obtenues par le séquençage de gène de ménage *rpoB*.



**Figure 19:** L'arbre phylogénétique du typage par le séquençage du gène *rpoB*

Dans cette étude phylogénétique, les espèces ont été réparties entre trois principaux clades, et les branches résultantes regroupaient les espèces en sous-groupes phylogénétiques. Il n'y a pas de chevauchement entre les différentes espèces au sein des groupes; chaque espèce était clairement regroupée dans son groupe phylogénétique adéquat. En plus, des clades monophylétiques ont été observés dans le

groupe *B. cereus*, le groupe *B. subtilis* et le sous groupe *B. Pumilus* qui à l'origine appartient groupe *B. subtilis*.

Le clade du groupe *B. cereus* a classé les espèces sur deux branches différentes ; la première branche est divisée en deux sous embranchements, l'une d'elle regroupe les espèces de *B. cereus* en deux sous embranchements secondaire pour les souches (L221, L243 et LF173), et le deuxièmes sous embranchement a classé l'espèce *B. thuringiensis* (L192 et L212). La deuxième branche du clade de groupe *B. cereus* englobe l'espèce *B. anthracis* pour les souches (L162, L154, L151, L262, L224, LF175, C156, LF262 et LF263).

Pour le clade du groupe *B. subtilis*, une branche a été générée pour chaque espèce. Les souches (LF194, LF235, LF293, LF219, L251, LF291, LF181, LF232, L296, LF217, LF183, C291, LF111 et L258) ont été regroupés dans la branche de l'espèce *B. licheniformis*, la souche (LF165) classé dans la branche de l'espèce *B. amyloliquefaciens* et la souche (LF234) classé dans la branche de *B. subtilis*.

Un autre clade se distingue également de cet arbre phylogénétique; c'est celui de l'espèce *B. safensis*, une espèce appartenant au sous groupe *B. pumilus*, où deux sous embranchements ont émergés, l'un pour les souches (L142, C126, L135 et L114) et le second pour la souche (L287).

Le gène *rpoB* a une existence universelle chez tous les procaryotes, ayant une fonction d'entretien ménager; le gène codant pour la sous-unité  $\beta$  de l'ARN polymérase a été utilisé dans plusieurs recherches comme marqueur pour l'écologie microbienne et aux études phylogénétiques (Ogier *et al.*, 2019; Ozdemir et Arslan 2019; Case *et al.*, 2007). L'utilité du gène *rpoB* réside dans la pertinence de ses séquences pour le typage, la différenciation des sous-types, l'étude phylogénétique des bactéries aérobies sporulées ainsi que d'autres bactéries étudiées dans plusieurs recherches et qui ont mis en évidence une grande diversité génétique pour les isolats obtenus. (Ogier *et al.*, 2019;Ozdemir et Arslan, 2019; Kent *et al.*, 2016. Kovac *et al.*, 2016, Ivy *et al.*, 2012, Ki *et al.*, 2009; Adékambi *et al.*, 2008; Case *et al.*, 2007; Durak *et al.*, 2006). De plus, le gène *rpoB* a montré un pouvoir discriminatoire entre des bactéries aérobies sporulées étroitement apparentées dans les produits laitiers et dans l'environnements de production (Ivy *et al.*, 2012;Durak *et al.*, 2006; Case *et al.*, 2007; Kent *et al.*, 2016 ).

Dans cette étude, l'analyse phylogénique était similaire à celles obtenues par Ivy *et al* (2012) et Durak *et al* (2006). L'arbre phylogénétique basé sur la séquence du

gène *rpoB* a révélé une cohérence avec l'historique évolutive des espèces de *Bacillus*, et il a fourni une haute résolution parmi les isolats génétiquement étroitement liés.

Les souches étudiées appartenait au groupe *B. cereus*, le groupe *B. subtilis* et le sous groupe *B. pumilus* étaient bien discriminés phylogénétiquement. Selon des études antérieures, le gène *rpoB* offrait une meilleure résolution phylogénétique en particulier entre les espèces étroitement apparentées et améliorait la résolution pour les analyses à échelle fine (Ogier *et al.*, 2019, Adékambi *et al.*, 2008; Case *et al.*, 2007; Durak *et al.*, 2006).

Au sein du groupe *B. cereus*, nous avons noté des branches distinctes pour chacune des espèces de *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. anthracis*, ce qui donne une idée claire de la résolution phylogénétique du gène *rpoB*. De plus, le pouvoir séparateur du gène *rpoB* a révélé la véritable image du groupe *B. cereus* avec l'apparition de *B. anthracis* qui se démarque des autres membres tels que *B. cereus* et *B. thuringiensis*.

Ko et ses collaborateurs (2003) ont rapporté que *B. anthracis* et les espèces les plus proches peuvent être différenciées par la séquence *rpoB*. À cet égard, il est très intéressant de souligner la présence de *B. anthracis* dans la PLI, par ce que à notre connaissance, c'est la première fois que cette espèce est détecté dans ce type d'aliment, et un tel pathogène représente un risque majeur pour les nourrissons en provoquant une infection humaine mortelle, la présence de ce pathogène donne une idée sur le niveau d'hygiène appliqué au niveau de la chaîne production de la PLI.

Nos résultats été conformes à ceux obtenus par Ki *et al* (2009). La résolution de *Bacillus* spp. sur l'arbre phylogénétique *rpoB* était environ 4,5 fois plus élevée que sur l'arbre phylogénétique ARNr 16S, et le gène *rpoB* pour *Bacillus* avait une distance génétique plus élevée. Cependant, ils ont enregistré moins de discrimination entre *B. cereus* et *B. anthracis* avec l'arbre phylogénétique *rpoB* par rapport à l'arbre phylogénétique ARNr 16S (Ki *et al.*, 2009).

Ozdemir et Arslan (2019), ont constaté que les phylogénies de l'ARNr 16S et de la base du gène *gyrB* étaient plus congruentes que l'arbre générée par les séquences du gène *rpoB*, et sont arbre phylogénétique n'a montré une séparation distinct au sein du groupe *B. cereus*. Cependant, Selon Durak *et al* (2006), le séquençage *rpoB* a permis d'améliorer la discrimination des sous-types par rapport au séquençage de l'ADNr

16S ; par conséquent, le séquençage *rpoB* permet à la fois la discrimination sensible des sous-types ainsi que l'identification des espèces et des genres (Durak *et al.*, 2006).

Par ailleurs, les espèces du groupe *B. subtilis* de cet étude ont été bien séparées les unes des autres, et *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* et *B. subtilis* sont regroupées distinctement, où le plus grand nombre d'isolats était enregistré dans les taxons *B. licheniformis*. Dans le travail de Chun et Bae (2000), ils ont signalés que *rpoB* devrait fournir des preuves concluantes sur les relations évolutives de *B. subtilis* et des taxons apparentés. Durak *et al* (2006) ont rapporté également que le séquençage du gène *rpoB* a permis de différencier 29 sous-types parmi les 57 isolats caractérisés. Les analyses phylogénétiques des séquences *rpoB* ont révélé des lignées monophylétiques distinctes, et corrélées avec des genres bactériens de *Bacillus* et *Paenibacillus*.

Les isolats du sous groupe *B. pumilus* ont été regroupés avec l'espèce *B. safensis* avec un clade distinct; cette dernière est génétiquement très proche de la souche *B. pumilus*, ce qui corrobore avec les travaux de Branquinho *et al* (2014). Le pouvoir séparateur de l'arbre phylogénétique *rpoB* sépare distinctement ces deux souches étroitement liées, ce qui explique la différenciation au sein du groupe *B. pumilus* à travers l'arbre phylogénétique du *rpoB*. Liu *et al* (2013) ont été les premiers à rendre compte de la diversité et de la phylogénie du groupe *B. pumilus* et de la plupart des souches attribuées à *B. safensis*, formant un groupe taxonomique distinct.

L'analyse des sous-types isolés au fil du temps dans les produits laitiers a révélé la présence de sous-types bactériens persistants et transitoires, ce qui indique que l'application de ces méthodes peut améliorer notre compréhension de l'écologie de ces organismes de détérioration et peut également aider pour identifier les niches bactériennes qui peuvent contribuer au contrôle de ces organismes de détérioration dans les systèmes alimentaires (Durak *et al.*, 2006).

## V. Antibiogramme

Les souches de *Bacillus cereus* isolées de la PLI dans cette recherche ont subi une étude d'antibiorésistance afin d'évaluer leurs résistances vis à vis les différents antibiotiques testés. Ces dernières présentaient des profils de divers degrés de sensibilité aux divers antibiotiques expérimentés dans cette recherche (**Figure 20**).



## Résultats et discussion

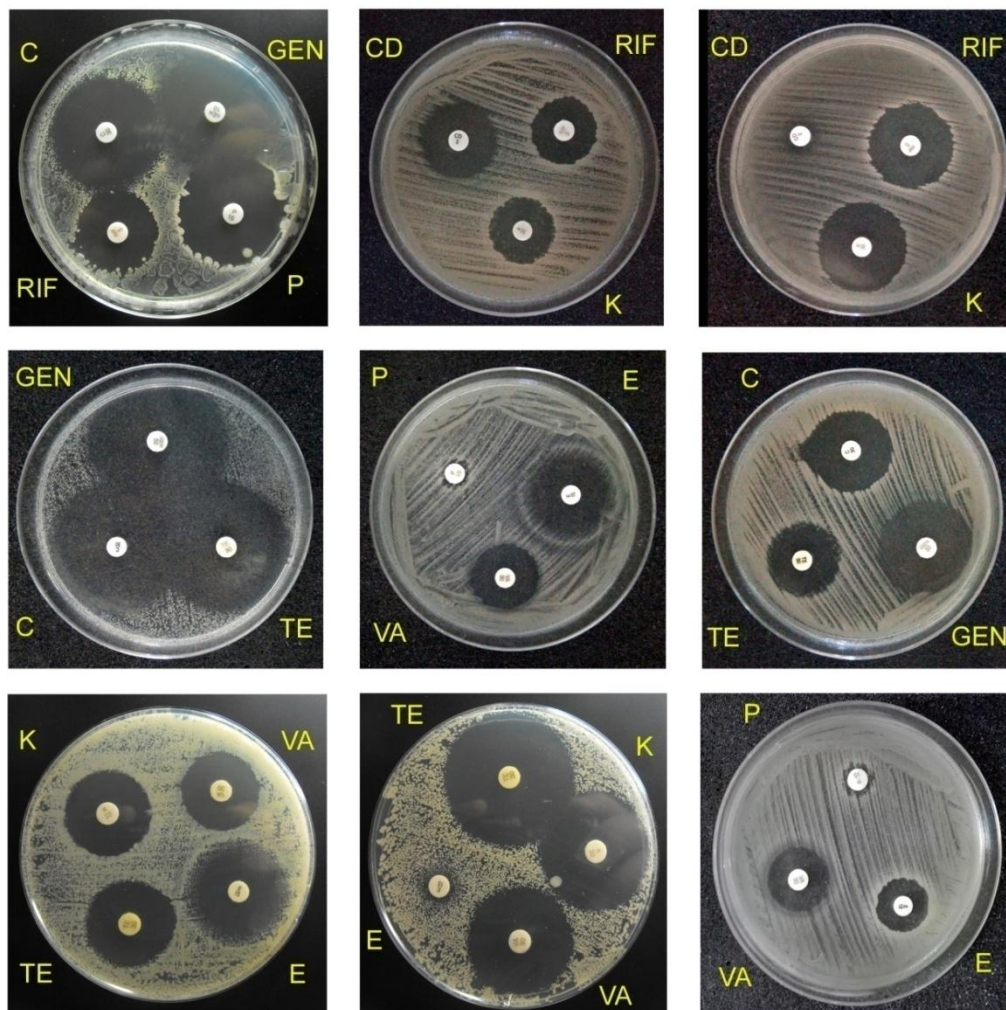
Les résultats des tests de ces antimicrobiens sont présentés en détail dans le **Tableau 10**.

La majorité des souches étaient sensibles aux antibiotiques testés. Cependant la résistance à la pénicilline G était prédominante avec un taux de 81%. Aussi on a enregistré un taux de résistance de 2.5% pour la Clindamycine, la souche L114 en fait partie et surtout que cette dernière abritait 8 gènes de toxines. En outre, aucun profil de multirésistance n'a été observé parmi les souches étudiées.

**Tableau 10:**Résultats d'antibiogramme des souches de *Bacillus cereus* isolées de la PLI.

Familles	Antibiotique	Charge de disque	% des souches		
			Résistantes	Intermédiaires	Sensibles
<b>β- Lactamine</b>	Pénicilline G	10 µl	81%	9%	10%
<b>Tétracycline</b>	Tétracycline	30µg	0%	2.5%	97.5%
<b>Macrolide</b>	Erythromycine	15µg	0%	0%	99.99%
<b>Phénicolés</b>	Chloramphénicol	30µg	0%	1.2%	98.8%
<b>Glycopeptide</b>	Vancomycine	30µl	0%	3.3%	96.7%
	Gentamycine	10µg	0%	1.7%	98.3%
<b>Aminoside</b>	Kanamycine	30µg	0%	2.5%	97.5%
<b>Lincosamides</b>	Clindamycine	02µg	2.5%	16%	81.5%





(P) Pénicilline G, (TE) Tétracycline, (E) Erythromycine, (C) Chloramphénicol, (VA) Vancomycine, (GEN) Gentamycine, (K) Kanamycine, (CD) Clindamycine

**Figure 20** : Photos des résultats de l'antibiogramme (photos crédit personnel).

L'étude de l'antibiogramme a révélé que la quasi-totalité des souches ont montrées une sensibilité à la Tétracycline, Erythromycine, Chloramphénicol, Gentamycine, Kanamycine, Vancomycine et la Clindamycine. En effet, la vancomycine, la clindamycine, la ciprofloxacine et la gentamicine peut être utilisée pour traiter les infections des *Bacillus* spp. en particulier *Bacillus cereus* (Arslan *et al.*, 2014 ; Chon *et al.*, 2012 ; Farrar et Reboli, 2006).

Les antibiotiques sont efficaces pour le traitement de plusieurs types d'infections et de maladies et même celles causées par les espèces du genre *Bacillus* (EFSA, 2016). Malheureusement, la résistance aux antibiotiques rend le traitement

plus difficile (Bennett, 2008). Cela pèse sur le système de soins de santé car la durée des hospitalisations et le prix des traitements augmentent. De nombreuses personnes sont à risque, en particulier les enfants en bas âge et les nouveaux nés (Alanber *et al.*, 2019 ; Groer *et al.*, 2015). La résistance aux antibiotiques constitue un problème de santé publique dans le monde entier (Bennett, 2008), et le nombre d'infections résistant aux antibiotiques ne cesse d'augmenter (Zhao *et al.*, 2020 ; EFSA, 2016 ; Arslan *et al.*, 2014 ; Bottone, 2010). Le danger de la résistance aux antibiotiques, c'est que des maladies que l'on peut soigner ou des infections mineures pourraient devenir plus compliquées. Cela pourrait imposer un fardeau économique et émotionnel plus lourd aux familles et à notre système de soins de santé.

Des études antérieures, ont rapportées que les isolats de *Bacillus cereus* ainsi que d'autres espèces de *Bacillus* spp. ont montré une forte résistance à la pénicilline (Patel *et al.*, 2009 ; Özçelik et Çıtak, 2009). Selon Murray *et al.* (2005), la résistance  $\beta$ -lactamines telle que la pénicilline et à l'ampicilline ainsi qu'aux céphalosporines a été le plus souvent observée pour les *Bacillus* spp. ce qui est dû à la production abondante de  $\beta$ -lactamases par les *Bacillus* (Arslan *et al.*, 2014 ; PHS et NHS, 2018). *Bacillus* spp. sont productrices de bêta-lactamases à spectre étendu et surtout prévalentes dans la PLI (Alanber *et al.*, 2019). Le génome de type sauvage de nombreuses bactéries, y compris les espèces de *Bacillus*, possèdent des gènes codant pour la production de  $\beta$ -lactamases. Cependant, ces  $\beta$ -lactamases chromosomiques ne fournissent généralement pas une résistance aux antibiotiques efficaces dans les souches de type sauvage, malgré les preuves que les gènes ne sont pas complètement réduits au silence (Chen *et al.*, 2003).

Bien que de nombreuses études menées sur la sécurité microbienne et chimique du lait en poudre pour nourrissons, il existe peu d'études concernant la résistance des *Bacillus* spp. aux antibiotiques (Alanber *et al.*, 2019 ; Halk *et al.*, 2010), et surtout que ces bactéries peuvent persister par leurs spores à travers ce produit jusqu'au moment de la consommation de PLI (Zhao *et al.*, 2020). L'émergence accélérée de la résistance aux antibiotiques chez les *Bacillus* spp. en particulier *Bacillus cereus* est une menace pour la gestion des maladies infectieuses (Zhao *et al.*, 2020 ; EFSA, 2016 ; Arslan *et al.*, 2014 ; Bottone, 2010). L'évolution de la gastro-entérite à *B. cereus* étant courte et sans complication, un traitement symptomatique est adéquat. Cependant, le traitement des autres infections à *Bacillus* est compliqué par le fait

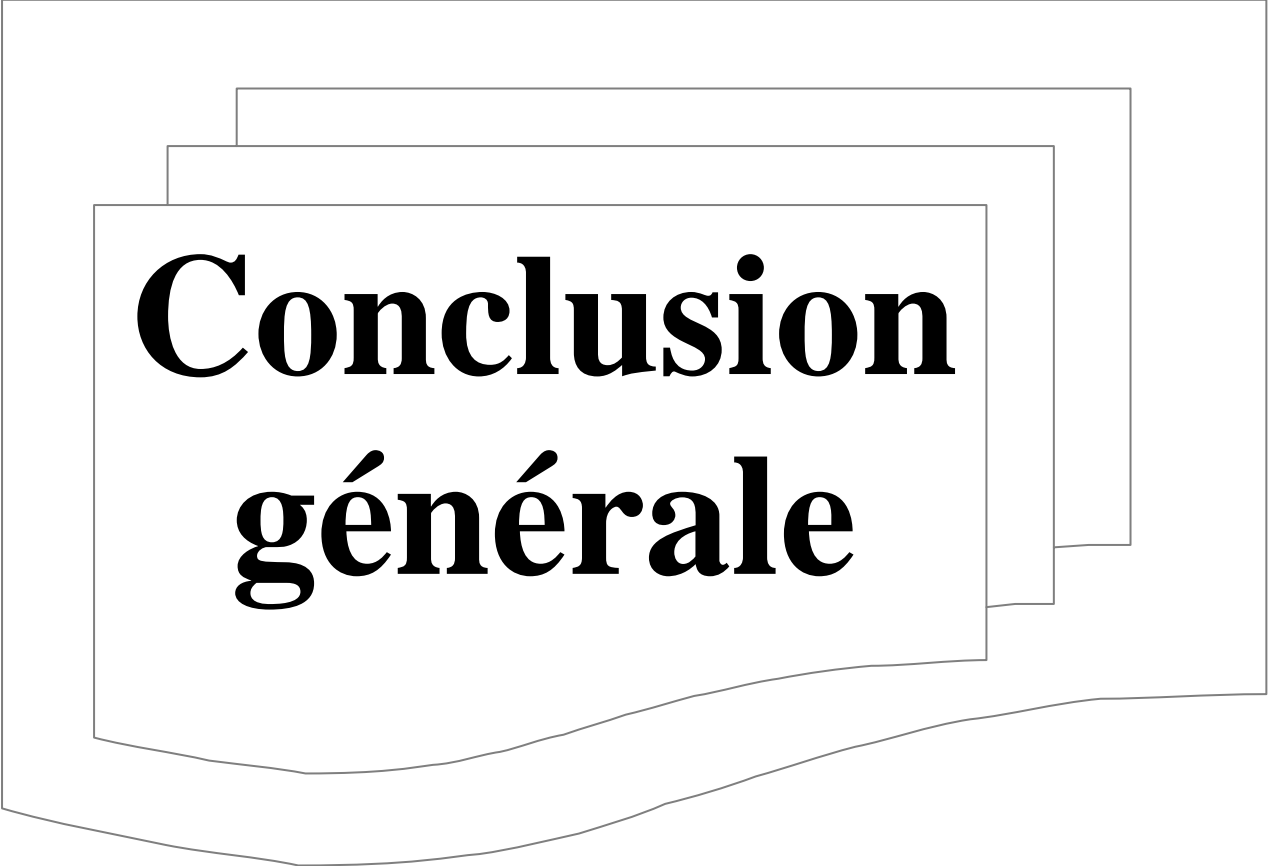
qu'elles ont une évolution rapide et progressive et une incidence élevée de multirésistance (Arslan *et al.*, 2014). Étant donné que *B. cereus* a une signification clinique, il est essentiel de déterminer sa résistance ou non aux agents antimicrobiens pour le traitement en cas d'épidémie (Owusu-Kwarteng *et al.*, 2017). Des rapports antérieurs ont montré la plupart des souches que *B. cereus* sont sensible à la vancomycine, au chloramphénicol, aux aminosides, à la ciprofloxacine, à l'érythromycine, à la clindamycine, à la kanamycine, et à la gentamicine (Zhao *et al.*, 2020 ; EFSA, 2016 ; Bottone, 2010). Certaines souches de *B. cereus* sont modérément sensibles à la tétracycline (Murray *et al.*, 2007) et à la clindamycine (Zhao *et al.*, 2020). Les quatre résistances les plus retrouvées pour le groupe *Bacillus cereus* sont à la clindamycine (lincosamide) qui arrive jusqu'à 60 % des souches étudiées, la tétracycline de 10 à 33 %, lévofloxacine (fluoroquinolone) environ 10 %, mais les résistances à la vancomycine et à l'érythromycine sont rares observées (EFSA, 2016). Selon Lepsanovic *et al* (2017) et Arslan *et al* (2014) la résistance à l'érythromycine et à la vancomycine était observée dans certaines souches de *B. cereus*.

Dans une étude similaire réalisée par Organji *et al* (2015) sur des échantillons de la PLI, a révélé que 100% des souches de *B. cereus* ont été sensible à la vancomycine et l'érythromycine. Dans une autre étude réalisée par Lepsanovic *et al* (2017), ils ont révélé que toutes les souches de *B. cereus* isolées de la PLI été sensibles à la tétracycline, à la ciprofloxacine, à l'imipénème et à la vancomycine.

D'un autre coté, les souches de *B. cereus* isolés du lait et des produits laitiers étaient principalement résistants aux  $\beta$ -lactamines telle que pénicilline G et l'ampicilline (Zhao *et al.*, 2020 ; Lepsanovic *et al.*, 2017 ; EFSA, 2016 ; Organji *et al.*, 2015). En raison de la présence de gènes  $\beta$ -lactamases dans presque toutes les souches de toutes les espèces du groupe *B. cereus* une large résistance observée aux  $\beta$ -lactamines, à l'exception de *B. anthracis* qui présente une sensibilité à ces dernier (EFSA, 2016). Bien que *B. anthracis* porte à la fois les gènes  $\beta$ -lactamases bla1 et bla2, leurs expressions est réprimées (Chen *et al.*, 2003). Les gènes responsables de ces résistances aux antibiotiques sont généralement localisés sur le chromosome, bien que certains soient inclus sur des éléments mobiles tels que les plasmides (EFSA, 2016). Dès 1978, Bernhard *et al* (1978) ont décrit pBC16, un petit plasmide de *B. cereus* résistant à la tétracycline. De même, les gènes tetA et tetB associés au plasmide ont été signalés dans une souche de *B. cereus* d'origine alimentaire. Les bactéries du groupe *B. cereus* ont le potentiel d'échanger matériel génétique par

conjugaison et transduction, avec une grande efficacité, par exemple les gènes de résistance aux antimicrobiens sont situés sur des plasmides conjugatifs ou mobilisables. Bien que des cas de transfert horizontal de gènes aient été largement décrits dans des études de laboratoire conditions (et certaines conditions environnementales contrôlées), la fréquence et l'efficacité dans la nature sont encore largement méconnu (EFSA, 2016).

Jusqu'à présent, l'utilisation d'antibiotiques a toujours été considérée comme le moyen le plus efficace pour traiter l'infection à *B. cereus* (Arslan *et al.*, 2014 ; Farrar et Reboli, 2006). Cependant, des souches de *B. cereus* résistantes aux antibiotiques ont été détectées en raison de l'utilisation imprudente à long terme d'antibiotiques d'où de l'émergence de gènes résistants (Bennett, 2008), résultant en un transfert horizontal de gènes (Halket *et al.*, 2010). En particulier, l'émergence de souches multirésistantes qui augmente le risque d'infection, entraînant un échec du traitement antibiotique. Il a été rapporté que les infections causées par des bactéries résistantes peuvent être mortelles pour les nourrissons, et dans le monde, plus de 200 000 nouveau-nés meurent chaque année d'infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques (Groer *et al.*, 2015). En termes de sécurité alimentaire la présence des souches résistantes aux antibiotiques et à la fois associé à un arsenal de gènes de toxicité, représente un grand risque pour les nourrissons, ces consommateurs sont très fragile à cause de leur système immunitaire qui n'est pas complètement installé et développé pour faire face à des pathogènes qui peuvent engendrer des problèmes très graves pour la santé des bébés et des enfants. Ainsi, il est raisonnable que la sécurité des produits utilisés pour les nourrissons soit davantage scrutée que celle des aliments destinés aux adultes, qui ont développé plusieurs mécanismes immunitaires de protection contre les pathogènes.



# **Conclusion générale**

## Conclusion générale

Les PLIs sont formulés pour imiter le maximum possible la composition nutritionnelle du lait maternel. Sa composition est riche en nutriments, donc il représente un excellent milieu pour le développement des bactéries. Cependant, les nourrissons sont sensibles aux infections bactériennes en raison de leur système immunitaire sous-développé.

En conclusion, la PLI est un produit alimentaire qui héberge une communauté microbienne diversifiée telle que la bactéries aérobies mésophiles totales et les spores bactériennes, et, ce, malgré une production qui suit des normes d'hygiène sévères, en exigeant un niveau de qualité microbiologique très élevé conformément aux critères microbiologiques nationaux et internationaux.

Ce travail est une ébauche à l'évaluation du risque lié à la consommation de la PLI commercialisée en Algérie. Les analyses microbiologiques ont révélées que la charge des bactéries aérobies mésophiles totales et des bactéries aérobies sporulées dans la quasi-totalité des échantillons de la PLI testés été en dessous des seuils limites exigés par la réglementation. Néanmoins, il a été révélé que 1,5% des échantillons avait une charge des bactéries aérobies mésophiles totales  $>10^4 \log_{10}$  ufc/g ainsi que 18,5% des échantillons avait une charge  $>2,7 \log_{10}$  spore/g de *B. cereus* selon la réglementation algérienne des critères microbiologiques appliquée pour la PLI (JORA, 2017). Ce constat fournit des informations très utiles sur l'état d'hygiène de la chaîne de production appliqué au niveau de l'usine. Il est important aussi de noter que la contamination de la PLI du 2<sup>ème</sup> âge par des bactéries aérobies mésophiles totales et les spores aérobies été plus élevés que celle de la PLI pour le 1<sup>er</sup> âge ; cette révélation donne probablement une idée sur la différence des ingrédients de base utilisés pour les deux âges, la différence de leurs origines et le type de traitement thermique appliqué pour chaque âge de PLI.

Cette recherche a mis en lumière le potentiel d'altération élevé des bactéries aérobies sporulées isolées de la PLI, en produisant une grande variété d'enzymes extracellulaires. Les deux tiers (2/3) des isolats ont été positifs à toutes les activités hydrolytiques testées ainsi qu'au test d'hémolyse, sachant que l'activité hémolytique est un indicateur important du potentiel pathogène plutôt que la capacité d'altération. Aussi, en raison de la présence des bactéries aérobies sporulées dans la PLI et surtout accompagnées de leur potentiel d'altération, l'industrie de la PLI est confrontée à un problème majeur et à un grand défi.



## Conclusion générale

La technique MALDI-TOF utilisée pour l'identification des bactéries aérobies sporulées isolées de la PLI a révélée la présence de dix (10) différentes espèces, avec une prédominance de *B. licheniformis* suivi par *B. cereus*. Cette grande hétérogénéité et diversité génotypique donne un aperçu sur la prévalence des spores de *Bacillus* spp. dans la PLI, surtout que certaines espèce peuvent jouer un rôle important dans les maladies d'origine alimentaire telle que *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus*.

Par ailleurs, il est intéressant de noter qu'un peu plus de la moitié des d'échantillons de la PLI été contaminés par *B. cereus*, ce pathogène opportuniste associé aux maladies gastro-intestinales d'origine alimentaire, est impliqué souvent dans deux types d'intoxications alimentaires caractérisées par des vomissements et / ou de la diarrhée, et d'une autre part, il a été aussi la cause de méningo-encéphalite hémorragique sévère chez des nourrissons prématurés. Ces pathogènes peuvent avoir de graves conséquences sur la santé des consommateurs potentiellement sensibles et fragiles, a cause de l'absence d'un système immunitaire développé et d'une flore commensale complète qui peut agir comme barrière à l'infection dans le tube digestif.

La technique de biologie moléculaire « PCR » utilisée pour la recherche des gènes de virulence a révélé la présence de gènes d'entérotoxines diarrhéiques associés à l'intoxication alimentaire détectés dans certaines souches de *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* et *L. sphaericus*. En conséquence, ces souches sont capables de produire des toxines. En raison de la pathogenèse évidente de *B. cereus*, de nombreux pays ont réglementé sa présence dans la PLI. En outre, l'abondance sans limite spécifique du groupe *Bacillus subtilis* en particulier *B. licheniformis* dans la PLI peut poser un risque pour la santé des nourrissons en particulier avec les souches qui hébergent les gènes de toxicines. De ce fait, il est nécessaire de souligner que la détection de ces facteurs de virulences dans les espèces autres que *B. cereus* soulève un sérieux problème de santé pour les nourrissons concernant la présence des *Bacillus* spp. dans la PLI, d'où la nécessité d'un contrôle sévère des spores de *Bacillus* dans cet aliment.

La biodiversité des bactéries aérobies sporulées a été évaluée par un typage moléculaire basé sur le séquençage du gène *rpoB* ; cette séquence a prouvé son utilité et sa pertinence en montrant un pouvoir discriminant important par différenciation des espèces étroitement apparentées et les plus rapprochées génétiquement. Cette

## Conclusion générale

discrimination a mis aussi en évidence une grande diversité génétique au sein des bactéries aérobies sporulées isolées de la PLI, à savoir : le groupe *B. cereus*, groupe *B. subtilis* et le groupe *B. pumilus*. Le pouvoir séparateur du gène *rpoB* a révélé la véritable image du groupe *B. cereus* avec l'apparition de *B. anthracis*. À notre connaissance, c'est la première fois que *B. anthracis* a été détecté dans la PLI, et un tel pathogène représente un risque majeur pour les nourrissons en provoquant une infection humaine mortelle.

Dans cette recherche, l'étude de l'antibiorésistance n'a pas détecté des souches de *B. cereus* multi-résistantes ; cependant certaines souches résistantes décelées sont pourvues d'un arsenal de virulence indiqué par la présence des gènes d'entérotoxines diarrhéiques ; ces derniers peuvent augmenter leur pouvoir pathogène en causant ainsi une menace pour la santé des nourrissons y compris dans la gestion de maladies infectieuses plausibles.

A l'issue de cette étude, nous avons pu constater que le traitement thermique qui représente en réalité une étape cruciale pour assurer la sécurité sanitaire du produit final est insuffisant pour éliminer toutes les spores bactériennes dans la PLI. Toutefois, le taux des spores peut être réduit si une analyse des risques avec un système de contrôle de points critique HACCP sont mis en œuvre pendant la fabrication. Par ailleurs, nous suggérons aussi d'intensifier l'application des Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH), Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) sur tout le processus de production. En outre, il est nécessaire que les soignants, les nourrices et les mamans soient sensibilisées à suivre les exigences de l'OMS pour la préparation de la PLI, qui insiste notamment à ce que l'eau utilisé doit être à 70°C au minimum. Il est nécessaire de raccourcir le temps entre la préparation et la consommation de la PLI afin de réduire le risque de germination des spores et la prolifération de *Bacillus* spp. en plus, les composants du biberon et les ustensiles utilisés pour la préparation de la PLI doivent être lavés en profondeur avec un détergent et une brosse pour éviter la formation de biofilms.

Sur la base de ce qui précède on peut dire que la PLI n'est pas un produit stérile, et, surtout, qu'il existe peu d'informations dans la littérature sur la pathogénie des *Bacillus* spp. autres que *B. cereus* isolés de la PLI, sachant de plus qu'une compréhension plus approfondie des bactéries aérobies sporulées et principalement la prévalence de *B. cereus* dans la PLI commercialisés en Algérie fait encore défaut.



## Conclusion générale

De ce fait, cette recherche contribue à élargir les connaissances actuelles sur la qualité microbiologique globale, le potentiel d'altération et en particulier sur l'occurrence, les caractéristiques phénotypiques et génotypiques des bactéries aérobies sporulées dans la PLI commercialisée en Algérie.

Ces résultats suggèrent que la présence des bactéries aérobies sporulées dans la PLI peut poser un risque pour la santé des nourrissons, principalement en raison de la fréquence élevée de souches hébergeant un ou plusieurs gènes de toxines.

Les résultats de cette étude contribuent également avec des données pour une meilleure compréhension de la contamination de la PLI par les bactéries aérobies sporulées, et fournit une base théorique qui peut servir de clé dans la définition de stratégies de contrôle efficaces au cours de la chaîne de fabrication.

### **Perspectives :**

Enfin, nous pensons qu'il est nécessaire de connaître la diversité complète des bactéries dans la PLI, y compris les bactéries viables mais non cultivables, grâce aux techniques moléculaires avancées.

Il est également important de comprendre les facteurs qui influencent ou déclenchent la production d'enzymes des *Bacillus* spp. dans la PLI.

Des analyses complémentaires permettraient d'identifier et de quantifier les différents types de toxines susceptibles d'être largués par les *Bacillus* spp. dans la PLI.

L'étude a indiquée la nécessité de mener des recherches supplémentaires sur la contamination de la PLI par *Bacillus* spp. afin d'améliorer et mettre à jour les critères microbiologiques à chaque fois qu'il en est nécessaire en Algérie.



**Références**

**Bibliographiques**

## Références bibliographiques

1. Abdullah Sani, N., Hartantyo, S.H.P., Forsythe, S.J. 2013. Microbiological assessment and evaluation of rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas and infant foods in Malaysia. *J Dairy Sci.* 96: 1-8.
2. Adékambi, T., Shinnick, T. M., Raoult, D., & Drancourt, M. 2008. Complete *rpoB* gene sequencing as a suitable supplement to DNA-DNA hybridization for bacterial species and genus delineation. *Int J Syst Evol Micr.* 58, 1807–1814.
3. Agroligne. 2015. *ECONOMIE : Le Marché des Industries Alimentaires en Algérie.* N° 97. Consulté le 19-08-2020. <http://liberte-algerie.com/actualite/une-industrie-dependante-des-importations-214201/print/1>
4. Ahern, G. J., Hennessy, A. A., Ryan, C. A., Ross, R. P., Stanton, C. 2019. Advances in Infant Formula Science. *Annual Review of Food Science and Technology.* 10, 75-102.
5. Alanber, N.M., Alharbi, N.S., Khaled, J.M. 2019. Evaluation of multidrug-resistant *Bacillus* strains causing public health risks in powdered infant milk formulas. *Journal of Infection and Public Health.* 13(10):1462-1468.
6. Alvarenga, V. O., Campagnollo, F. B., Pia, A. K. R., Conceição, D. A., Abud, Y., Sant'Anna, C., Hubinger, M.D., Sant'Ana, A.S. 2018. Quantifying the Responses of Three *Bacillus cereus* Strains in Isothermal Conditions and During Spray Drying of Different Carrier Agents. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1113.
7. Andersson, M.A., Jääskeläinen, E.L., Shaheen, R., Pirhonen, T., Wijnands, L.M., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International Journal of Food Microbiology* 94(5), 1453–1457.
8. Andrew, J et Schuman. 2003. A concise history of infant formula (twists and turns included). *Contemporary Pediatrics.* p: 91-103.
9. Arsalan, A., Bagir, S., Naqvi, S., Ali S.I., Anwar, Z. 2013. Contamination of microorganisms in pediatric infant formula marketed in Karachi. *Ann Food Sci Technol.* 14, 90-99.
10. Arslan, S., Eyi, A., Küçüksarı, R. 2014. Toxigenic genes, spoilage potential and antimicrobial resistance of *Bacillus cereus* group strains from ice cream. *Anaerobe* 25: 42-46.
11. Baker, P., Smith, J., Salmon, L., Friel, S., Kent, G., Iellamo, A., Renfrew, M. J. 2016. Global trends and patterns of commercial milk-based formula sales: Is an unprecedented infant and young child feeding transition underway. *Public Health Nutrition*, 19(14), 2540–2550.

## Références bibliographiques

12. Beattie SH, Williams AG. 1999. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Letters in Applied Microbiology*; 28(3):221-225.
13. Becker, H., Schaller, G., von Wiese, W., & Terplan, G. 1994. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1), 1–15.
14. Beecher, D.J., Lee Wong, A.C., 2000. Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* solate. *Microbiology* 146, 1371–1380.
15. Bennett, P. 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 153(S1).doi 10.1038/sj.bjp.0707607
16. Bernhard, K., H. Schrempf, and W. Goebel. 1978. Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 133. PP :897–903.
17. Berthold, K. 2010. *Drivers of Innovation in Pediatric Nutrition*, Karger Publishers. P: 4.
18. Beylot, G. 2009. Conseil en pédiatrie. Les laits infantiles. *Actualités pharmaceutiques* • n° 488
19. Blanchard, E., Lisa, R.D., Zhu, P., Schuck P. 2013. *Infant formula powders*. © Woodhead Publishing Limited. 466-483.DOI: 10.1533/9780857098672.3.465
20. Bode, L. 2018. Human milk oligosaccharides in the prevention of necrotizing enterocolitis: A journey from in vitro and in vivo models to mother-infant cohort studies. *Frontiers in Pediatrics*. 6, 385.
21. Bottone, E. J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev*. 23, 382–398.
22. Brandl, H., C. Fricker-Feer, D. Ziegler, J. Mandal, R. Stephan, and A. Lehner. 2014. Distribution and identification of culturable airborne microorganisms in a Swiss milk processing facility. *J. Dairy Sci*. 97:240–246.
23. Branquinho, R., Meirinhos-Soares, L., Carriço, J.A., Pintado, M., Peixe, L.V. 2014. Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. *FEMS Microbiology Ecology*, 90, 689–698.
24. Brett, M.M., McLauchlin, J., Harris, A., O'Brien, S., Black, N., Forsyth, R.J., Roberts, D., Bolton, F.J. 2005. A case of infant botulism with a possible link to infant formula milk powder: evidence for the presence of more than one strain of *Clostridium botulinum* in clinical specimens and food. *J Med Microbiol* 2005; 54. PP :769-76.

## Références bibliographiques

25. Buchanan R. L., Oni R. 2012. Use of Microbiological Indicators for Assessing Hygiene Controls for the Manufacture of Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 75, (5), 989-97.
26. Buehner, K. P., Anand, S., Djira, G. D. 2015. Prevalence of thermophilic bacteria and spores in nonfat dry milk powders of Midwest origin. *J. DairySci.* 98, 2861–2866.
27. Burgess, S. A., Lindsay, D., Flint, S. H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2), 215-225.
28. Buxton, R. 2011. Nitrate and nitrite reduction test. American Society for Microbiology.
29. CAC (Codex Alimentarius Commission). 2007. Standards for Infant Formula and Formulas for Special Medical Purposes Intended for Infants; CODEX STAN 72-108; Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2007.
30. CAC. 2008. Code of Hygienic Practice for Powdered Infant Formula for Infants and Young Children; Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Rome, Italy.
31. Cahill, S. M., Wachsmuth, I. K., de Lourdes Costarrica, M., Ben Embarek, P.K. 2008. Powdered infant formula as a source of *Salmonella* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.* 46:268–273.
32. Caric, M. 1993. Concentrated and dried dairy products. In: Hui. Y.H. (editor). *Dairy Science and Technology Handbook*. VCH, New York. pp. 257-300.
33. Case, R. J., Boucher, Y., Dahllorf, I., Holmstrom, C., Doolittle, W. F., Kjelleberg, S. 2007. Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 278–288.
34. Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Ghelardi, E. 2019. Identification of *Bacillus* species: Implication on the quality of probiotic formulations. *PLOS One*, 14(5), e0217021.
35. Chap, J., Jackson, P., Siqueira, R., Gaspar, N., Quintas, C., Park, J., Osaili, T., Shaker, R., Jaradat, Z., Hartantyo, S. 2009. International survey of *Cronobactersakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 185–188.
36. Checinska, A., Paszczynski, A., Burbank, M. 2015. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annu Rev Food Sci Technol.* 6 : 351-69

## Références bibliographiques

37. Chen Y, Succi J, Tenover FC and Koehler TM, 2003. Beta-lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Journal of Bacteriology*, 185, 823–830.
38. Chitrakar, B., Zhang, M., BenuAdhikari, B., 2019. Dehydrated Foods: Are they Microbiologically Safe? *Crit Rev Food SciNutr*. 59, (17) 2734-2745.
39. Cho, T. J., Kim, H. W., Kim, N. H., Park, S. M., Kwon, J. I., Kim, Y. J., Lee, K.W., Rhee, M.S. 2018. New Insights into the Thermophilic Sporeformers in Powdered Infant Formula: Implications of Changes in Microbial Composition During Manufacture. *Food Control*, 92, 464-470.
40. Cho, T. J., Hwang, J. Y., Kim, H. W., Kim, Y. K., Il Kwon, J., Kim, Y. J., Lee, K.W., Kim, S.A., Rhee, M.S. 2019. Underestimated Risks of Infantile Infectious Disease from the Caregiver's Typical Handling Practices of Infant Formula. *Scientific Reports*, 9, 9799.
41. Chon, JW., Kim, JH, Lee, SJ., Hyeon, JY., Seo, KH. 2012. Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiol*. 32(1):217-22.
42. Chun, J., Bae, K. S. 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 123–127.
43. Codex Stan .73-1981. Norme Codex Pour Les Aliments Diversifiés De L'enfance «BabyFoods»
44. Coimbra, P.T., Balthazar, C.F., Guimarães, J.T., Coutinho, N.M., Pimentel, T.C., Neto, R.P.C., Esmerino, E.A., Freitas, M.Q., Silva, M.C., Tavares, M.I., Cruz, A.G., 2020. Detection of formaldehyde in raw milk by time domain nuclear magnetic resonance and chemometrics. *Food Control*. 110, 107006.
45. Cone TE. 1976. 200 Years of Feeding Infants in America. Columbus, OH: Ross Lab.
46. Coorevits, A., De Jonghe, V., Vandroemme, J., Reekmans, R., Heyrman, J., Messens, W., Heyndrickx, M. 2008. Comparative analysis of the diversity of aerobic spore-forming bacteria in raw milk from organic and conventional dairy farms. *Systematic and Applied Microbiology*, 31, 126–140.
47. Cortese, F., Scicchitano, P., Gesualdo, M., Filaninno, A., De Giorgi, E., Schettini, F., Laforgia, N., Ciccone M.M. 2016. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *PediatrNeonatal*. 57, 265-73.
48. Costa, P. V., Vasconcellos, L., da Silva, I. C., Medeiros, V., Forsythe, S. J., Brandão, M. L. L. 2020. Multi-locus sequence typing and antimicrobial susceptibility profile of

## Références bibliographiques

- Cronobactersakazakii* and *Cronobactermalonaticus* isolated from corn-based farinaceous foods commercialized in Brazil. Food Research International. 129, 108805.
49. D.H., Van Dael, P., Skanderby, M., Hugelshofer, W. 2009. Infant Formulae – Powders and Liquids. In TAMIME, A.Y. (ed.), *Dairy Powders and Concentrated Products*. Ayr, UK, Wiley-Blackwell, pp. 294–331.
50. De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., Herman, L., De Vos, P., Heyndrickx, M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore formers isolated from raw milk. International Journal of Food Microbiology, 136, 318–325.
51. De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B. 2009. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Volume Three, The Firmicutes. Springer, New York, USA.
52. Di Pinto, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Ceci, E., Terio, V., Tantillo, G. 2013. Occurrence of potentially enterotoxigenic *Bacillus cereus* in infant milk powder. European Food Research and Technology, 237(2), 275–279.
53. Dréan, P., C. M. McAuley, S. C. Moore, N. Fegan, E. M. 2015. Characterization of the spore-forming *Bacillus cereus* sensulato group and *Clostridium perfringens* bacteria isolated from the Australian dairy farm environment. BMC Microbiol. 15:38.
54. Durak, M. Z., Fromm, H. I., Huck, J. R., Zadoks, R. N., Boor, K. J. 2006. Development of molecular typing methods for *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. isolated from fluid milk products. Journal of Food Science, 71, 50–56.
55. EFSA Biohazrd Panel (EFSA panel on biological hazards). 2016. Scientific opinion on the risk for public health related to the precence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA J. 2016; 14(7):4524, 93.
56. EFSA. 2004. European Food Safety Authority: Opinion adopted by the BIOHAZ Panel related to the microbiological risks in infant formulae and follow-on formulae. EFSA Journal. 113, 1-35
57. EFSA. 2014. Scientific Opinion on the essential composition of infant and follow-on formulae. EFSA Journal. 12(7):3760.
58. Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtilbauer, E., Scherer, S. 2005. Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide-synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology 71 (1), 1105– 1113.

## Références bibliographiques

59. El-Gamal M.S., El Dairouty R.K., Okda A.Y., Salah Sahar H. and El-Shamy S.M. 2013. Incidence and Interrelation of *Cronobactersakazakii* and Other Foodborne Bacteria in Some Milk Products and Infant Formula Milks in Cairo and Giza Area. *World Appl. Sci. J.*, 26 (9): 1129-1141.
60. Fagerlund, A., Ween, O., Lund, T., Hardy, S.P., Granum, P.E. 2004. Genetic and functional analysis of the *cytK* family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*. 150, 2689–2697.
61. Farrar, W.E ; A.C, Reboli. 2006. The genus *Bacillus*-medical. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Stackebrandt E, Schleifer KH, editors. *The prokaryotes*. Minneapolis: Springer. pp: 609-30.
62. Flamant, H. 2018. Marché mondial des laits infantiles. <http://www.mon-cultivar-elevage.com/content/leurope-toujours-leader-demain>. Consulté le 19-08-2020. Publié le 11/07/2018.
63. Fomon SJ. 1987. Reflections on infant feeding in the 1970s and 1980s. *Am. J. Clin. Nutr.* 46:171–82.
64. Forsythe, S. 2014. Powdered Infant Formula. In Gurtler, Joshua B., Doyle, Michael P., Kornacki, Jeffrey L. (editor), *The Microbiological Safety Of Low Water Activity Foods And Spices*. Food Microbiology and Food Safety, Sringer editions. PP :177-211.
65. Forsythe, S.J., 2005. *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Matern. Child Nutr.* 2005, 1, PP : 44–50.
66. Fricker-Feer C. 2012. Identification and further characterization of *Enterobacteriaceæ* and *Cronobacterspp.* in a milk powder and infant formula processing plant. Thèse de doctorat.L'université Louis-et-Maximilien de Munich.
67. From, C., Hormazabal, V., Granum, P.E., 2007. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *International Journal of Food Microbiology* 115, 319–324.
68. From, C., Pukall, R., Schumann, P., Hormazabal, V., Granum, P. E. 2005. Toxin-producing ability among *Bacillus* spp. outside the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, PP : 1178–1183.
69. FSAI. Food Safety Authority of Ireland. 2014. Guidelines for the interpretation of results of microbiological testing of ready-to-eat foods placed on the market. Dublin, Ireland.
70. Gaillard, S; L, Leguérinel et P, Mafart. 1998. Modelling combined effect of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food. Microbiol.* 32: PP :225-233.



## Références bibliographiques

71. Gallagher, S et E, Wiley. (2008).Current Protocols Essential Laboratory Techniques. New York: John Wiley & Sons, Inc.978-0-470-08993-4.
72. Gopal, N., Hill, C., Ross, P. R., Beresford, T. P., Fenelon, M. A., and Cotter, P. D. 2015. The prevalence and control of *Bacillus* and related spore-forming bacteria in the dairy industry. *Front. Microbiol.* 6:1418.
73. Granato, D., Putnik, P., Kovacevic, D.B., Sousa Santos, J., Calado, V., Silva Rocha, R., Gomes Da Cruz, A., Jarvis, B., Rodionova, O.Y., Pomerantsev, A. 2018. Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. *ComprehensiveReviews in Food Science and Food Safety*, 17, PP : 663–677
74. Green, C. K., Shurley, T. 2016. What's in the Bottle? A Review of Infant Formulas. *Nutrition in Clinical Practice*, 31, PP : 723-729.
75. Groer, M.W., Gregory, K.E., Louis-Jacques, A., Thibeau, S., Walker, W.A. 2015. The very low birth weight infant microbiome and childhood health. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today. Reviews.* 105(4):PP :252–64.
76. Guinebretière, M. H., Broussolle V., Nguyen-The, C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food—poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *Journal of ClinicalMicrobiology*, 40, (8), PP : 3053–305.
77. Guiraud, J.P. 1998. Microbiologie alimentaire. Technique at Ingénierie. Agroalimentaire. ISBN. 2100036661, 9782100036660. Dunod.652 Pages.
78. Guiraud, J.P. 2012. Microbiologie alimentaire. Industries Agro-alimentaires. ISSN 1633-8456.ISBN 2100570080, 9782100570089, Dunod. 696 Pages.
79. Gurtler, J.B, Beuchat, L.R. 2007. Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. *J Food Prot.* 70: 2095–2103.
80. Halk, G., Dinsdale, A.E., Logan, N.A. 2010. Evaluation of the VITEK2 BCL card for identification of *Bacillus* species and other aerobic endospore-formers. *Lett ApplMicrobiol.* 50:PP : 120–6.
81. Haughton, P., Garvey, M., Rowan, N. J. 2010. Emergence of *Bacillus cereus* as a dominant organism in Irish retailed powdered infant formulae (PIF) when reconstituted and stored under abuse conditions. *Journal of Food Safety*, 30, PP : 814-831.
82. Heyndrickx, M. 2011. The importance of endospore-forming bacteria originating from soil for contamination of industrial food processing. *Applied and EnvironmentalSoil Science*, 2011. Article ID 561975, 11 pages.

## Références bibliographiques

83. Hilliard, N. J., Schelonka, R. L., Waites, K. B. 2003. *Bacillus cereus* bacteremia in a preterm neonate. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 3441 -3444.
84. Horner-Devine, M. C., K. M. Carney, B. J. Bohannon. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. Biol. Sci.* 271:PP : 113–122.
85. Hwang, J. Y., Park, J-H. 2015. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready to-eat foods. *Journal of Dairy Science*, 98, PP :1652-1660.
86. Iversen, C., S. Forsythe. 2004. Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*, 21, 771–777.
87. Ivy, R. A., Ranieri, M. L., Martin, N. H., den Bakker, H. C., Xavier, B. M., Wiedmann, M., Boor, K.J. 2012. Identification and characterization of psychrotolerant sporeformers associated with fluid milk production and processing. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, PP :1853–1864.
88. Jacobs, C., P. Braun, and P. Hammer. 2011. Reservoir and routes of transmission of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in a milk powder-producing plant. *J. Dairy Sci.* 94, PP :3801–3810.
89. Jeyaram, K., Romi, W., Singh, T.A., Adewumi, G.A., Basanti, K., Oguntoyinbo, F.A. 2011. Distinct differentiation of closely related species of *Bacillus subtilis* group with industrial importance. *Journal of Microbiological Methods*, 87: PP :161-164.
90. Joffin J. N., Leyral G. 2006. *Microbiologie Technique*. Tome 1, dictionnaire des techniques. Académie de bordeaux et crdp d'Aquitaine, France.
91. JORA (Journal Officiel de la République Algérienne). 2017. Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. 8- Aliments pour nourrissons et enfants en bas âge. JORA N° 39. Page N° 22.
92. Kent, D. J., Chauhan, K., Boor, K. J., Wiedmann, M., Martin, N. H. 2016. Spore test parameters matter: mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. *Journal of Dairy Science*, 99, PP : 5180 - 5191.
93. Kent, R.M., Fitzgerald, G.F., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P., 2015. Novel Approaches to Improve the Intrinsic Microbiological Safety of Powdered Infant Milk Formula. *Nutrients*. 7, PP :1217-1244

94. Ki, J.S., Zhang, W., Qian, P.Y. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *Journal of Microbiological Methods*, 77, PP :48–57.
95. Ko, K. S., Kim, J.M., Kim, J.W., Jung, B. Y., Kim, W., Kim, I.J., Kook, Y-H. 2003. Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, PP :2908–2914.
96. Kourti, T., MacGregor, J.F. 1995. Process analysis, monitoring and diagnosis, using multivariate projection methods. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 28, PP :3-21.
97. Kovac, J., Miller, R. A., Carroll, L. M.; Kent, D. J., Jian J., Beno, S. M., Wiedmann, M. 2016. Production of hemolysin BL by *Bacillus cereus* group isolates of dairy origin is associated with whole-genome phylogenetic clade. *BMC Genomics*, 17, 581, 2016.
98. Kramer, J.M., Gilbert, J.L. 1989. *Bacillus cereus* and others *Bacillus* species. In: Doyle MP (ed) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York.
99. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
100. Lepsanovic, Z., Djordjevic, V., Lakicevic, B., Savic, D., Velebit, B., Josic, D., Karabasil, N. 2018. Detection of toxin genes and randomly amplified polymorphic DNA typing of *Bacillus cereus* isolates from infant milk formulas. *Journal of food safety* 2018 Vol 38 no.4.
101. Lequin, M.H., Vermeulen, J.R., van Elburg, R.M., Barkhof, F., Kornelisse, R.F., Swarte, R., Govaert, P.P. 2005. *B. cereus* meningoencephalitis in preterm infants: neuroimaging characteristics. *AJNR Am J Neuroradiol*. 26:2137–2143.
102. Leyral G., Vierling E. 2007. *Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaire ; Biosciences et techniques*. Wolters Kluwer, France.
103. Lindsay, D., Laing, S., Fouhy, K.I., Souhoka, L., Beaven, A.K., Soboleva, T.K., Malakar, P.K., 2019. Quantifying the uncertainty of transfer of *Cronobacter* spp. between fomites and floors and touch points in dairy processing plants. *Food Microbiol*. 84, 103256.
104. Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. 2013. Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLOS One*, 8(11), e80097.

## Références bibliographiques

105. Logan, N. A. 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 417–429.
106. Lu, Y., Liu, P., Li, C., Sha, M., Fang, J., Gao, J., Xu, X., Matthews, K.R., 2019. Prevalence and Genetic Diversity of *Cronobacter* Species Isolated From Four Infant Formula Production Factories in China. *Front. Microbiol.* 10, 1938.
107. Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J., Ehling-Schulz, M. 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 270–279.
108. Lund, T., de Buyser, M.-L., Granum, P.E., 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol. Microbiol.* 38, 254–261.
109. Lund, T., Granum, P.E. 1997. Comparison of biological effect of the two different enterotoxin complexes isolated from three different strains of *Bacillus cereus*. *Microbiology* 143, 3329–3336
110. Manickam, N., Knorr, A., Muldrew, K.L. 2008. Neonatal meningoencephalitis caused by *Bacillus cereus*. *Pediatr Infect Dis J* 27:843–846.
111. Martinez, G.A., Dodd, D.A. 1983. 1981. Milk feeding patterns in the United States during the first 12 months of life. *Pediatrics* 71:166–70
112. Martins, Z.E., Pinho, O. Ferreira, I.M. 2017. Fortification of wheat bread with agroindustry by-products: statistical methods for sensory preference evaluation and correlation with color and crumb structure. *J. Food Sci.* 82, 2183-2191.
113. Masood, N., Moore, K., Farbos, A., Paszkiewicz, K., Dickins, B., McNally, A., Forsythe, S., 2015. Genomic dissection of the 1994 *Cronobactersakazakii* outbreak in a French neonatal intensive care unit. *BMC Genomics.* 16, 750.
114. Maughan, H., Van der Auwera, G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol.* 11(5):789–97.
115. McHugh, A. J., Feehily, C., Hill, C., Cotter, P. D. 2017. Detection and Enumeration of Spore-Forming Bacteria in Powdered Dairy Products. *Frontiers in Microbiology*, 8, 109.
116. McHugh, A.J., Feehily, C., Tobin, J.T., Fenelon, M.A., Hill, C., Cotter, P.D. 2018. Mesophilic sporeformers identified in whey powder by using shotgun metagenomic sequencing. *Appl Environ Microbiol.* 84:e01305-18.

117. Miller, R. A., Kent, D. J., Watterson, M. J., Boor, K. J., Martin, N. H., Wiedmann, M. 2015. Spore populations among bulk tank raw milk and dairy powders are significantly different. *J. Dairy Sci.* 98, 8492–8504.
118. Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile, L., Pérez, P.F. 2007. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 197–206.
119. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. 2005. *Medical microbiology*. Fifth ed. Philadelphia, Pennsylvania: Elsevier Mosby.
120. Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H. 2010. Food-borne diseases-The challenges of 20 years ago persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food. Microbiol.* 139, 3-15.
121. Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., Panbangred, W. 2008. Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 352–356.
122. Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., Priha, O., Salkinoja-Salonen, M. 2007. Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk. *Vet. Microbiol.* 124, 329–339. doi:10.1016/j.vetmic.2007.05.015
123. Ogier, J. C., Pagès, S., Galan, M., Barret, M., Gaudriault, S. 2019. rpoB, a promising marker for analyzing the diversity of bacterial communities by amplicon sequencing. *BMC Microbiology*, 19, 171.
124. Oliveira, R. B. A., Margalho, L. P., Nascimento, J. S., Costa, L. E. O., Portela, J. R., Cruz, A. G., Sant'Ana, A.S. 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: a review of sources, routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 11-19.
125. Oliveira, R. B. A., Lopes, L. S., Baptista, R. C., Chinha, A. A. I. A., Portela, J. B., Nascimento, J. S., Costa, L.E.O., Cruz, A.G., Sant'Ana, A.S. 2018. Occurrence, populations, diversity, and growth potential of spore-forming bacteria in “requeijão cremoso”. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 24-31.
126. Oluwole, M.D., Rotimi, C.F., Oluyeye, O.A. 2013. Pattern of breastfeeding and occurrence of *Cronobactersakazakii* in infant formula sold in Ekiti State, Nigeria. *Shiraz E-Medical Journal* Vol. 14, No. 1. 21-34.

127. Organisation coopération et de développement économiques (OCDE). Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. Lait et produits laitiers. Perspectives agricoles de l'OCDE et de la FAO 2019-2028 © OCDE/FAO 2019.
128. Organji, S.R., Abulreesh, H.H., Elbanna, K., Osman, G.E.H. 2015 .Occurrence and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* in food and infant feces. Asian Pac J Trop Biomed 2015; 5(7): 515–520.
129. Ouoba, L. I., Thorsen, L., Varnam, A. H. 2008. Enterotoxins and emetic toxins production by *Bacillus cereus* and other species of *Bacillus* isolated from Soumbala and Bikalga, African alkaline fermented food condiments. International Journal of Food Microbiology, 124, 224230.
130. Owusu-Kwarteng, J., Wuni, A., Akabanda, F., Tano-Debrah, k., Jespersen, L. 2017. Prevalence, virulence factor genes and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* sensu lato isolated from dairy farms and traditional dairy products. BMC Microbiology. 17:65.
131. Özçelik, B., Çıtak, S., 2009. Evaluation of antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolates in ice cream samples sold in Ankara. Turk J Pharm Sci .6:231-8.
132. Özdemir, F., Arslan, S. 2019. Molecular Characterization and Toxin Profiles of *Bacillus* spp. Isolated from Retail Fish and Ground Beef. Journal of Food Science, 0, 0.
133. Pages, M. 2015. Effets et mécanismes d'action de l'ozone utilisé comme moyen de lutte contre des champignons pathogènes du pommier : études in vitro et in vivo. Thèse de l'INPL Toulouse. Theses.fr, ID : 10670/1.9jcauw
134. Pajewska-Szmyt, M., Sinkiewicz-Darol, E., Gadzała-Kopciuch, R. 2019. The impact of environmental pollution on the quality of mother's milk. Environmental Science and Pollution Research. 26, 7405-7427.
135. Palmquist, A.E.L., Perrin, M.T., Cassar-Uhl, D., Gribble, K.D., Bond, A.B., Cassidy, T. 2019. Current Trends in Research on Human Milk Exchange for Infant Feeding. J Hum Lact. 35(3):453-477.
136. Patel, A.K., Ahire, J.J., Pawar, S.P., Chaudhari, B.L., Chincholkar, S.B. 2009. Comparative accounts of probiotic characteristics of *Bacillus* spp. isolated from food wastes. Food Res Int .42:505-10.
137. Pavic, S., Brett, M., Petric, I., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., Kovačić, A., Cetinić, E., Ropac, D. 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. Arch. Lebensmittel. 56, 20–22.

138. Pei, X., Shuran, S., Zhan, L., Zhu, J., Song, X., Hu, X., Liu, G., Ma, G., Li, N., Yang, D. 2018. Prevalence of *Bacillus cereus* in powdered infant and powdered follow-up formula in China. *Food Control*. 93, 101 – 105.
139. Pei, X., Li, Y., Zhang, H., Zhan, L., Yu, X., Lan, G., Jia, H., Li, N., Yang, D., Mei, L. 2019. Surveillance and characterisation of *Cronobacter* in powdered infant formula processing factories. *Food Control*, 96, 318-323.
140. Peña, W. E. L., de Andrade, N. J., Nilda, F. F., Soares, N. F. F., Alvarenga, V. O., SalatiRodrigues Junior, S. R., Granato, D., Zuniga, A.D., Sant'Ana, A.S. 2014. Modelling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *International Dairy Journal*, 34, 153-158.
141. Pereira, A. P. M., Sant'Ana, A. S. 2018. Diversity and fate of spore forming bacteria in cocoa powder, milk powder, starch and sugar during processing: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 76, 101-118.
142. Phelps, R. J., McKillip, J. L. 2002. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the *Bacillus cereus* group. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3147–3151.
143. Pia, A. K. R., Pereira, A. P. M., Costa, R. A., Alvarenga, V. O., Freire, L., Carlin, F., Sant'Ana, A.S. 2019. The fate of *Bacillus cereus* and *Geobacillus stearothermophilus* during alkalization of cocoa as affected by alkali concentration and use of pre-roasted nibs. *Food Microbiology*, 82, 99-106.
144. Prescott, L.M., Harley, J.P. Donald, A. 2003. *Microbiologie*. De Boeck Université, 2ème Edition Française. 128 : 28-29.
145. Proudly I, Bougle D, Leclercq R, Vergnaud M., 2008. Tracing of *Enterobacter sakazakii* isolates in infant milk formula processing by BOX-PCR genotyping. *J. Appl. Microbiol.*, 105(2):550-8.
146. Public Health England (PHE) / National Health Service (NHS). 2018. Identification of *Bacillus* species. Issued by the Standards Unit, Microbiology Services, PHE. *Bacteriology – Identification | ID 9 | Issue no: 3.1 | Issue date: 04.04.18 | Page: 1 - 27.*
147. Ramgopal, S., Walker, L.W., Tavarez, M.M., Andrew J. Nowalk, A.J., Melissa A. Vitale., 2019. Serious Bacterial Infections in Neonates Presenting Afebrile With History of Fever. *Pediatrics*. 144, e20183964.
148. Rather MA, Aulakh RS, Gill JP, Mir AQ and Hassan MN, 2012. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (tetA and tetB) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5, 709–712.



## Références bibliographiques

149. Reyes, J., Bastías, J. M., Gutierrez, M. R., & Rodríguez, M. O. 2007. Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, 24, 1–6.
150. Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu. Rev. Genet.* 38:525–552.
151. Rossini, K., Verdun, S., Cariou, V., Qannari, E.M., Fogliatto, F.S. 2015. PLS discriminant analysis applied to conventional sensory profiling data. *Food Quality and Preference*. Volume. 23, (1), 18-24.
152. Rowan, N. J., Anderson, J. G., Anderton, A. 1997. Bacteriological quality of infant milk formulae examined under a variety of preparation and storage conditions. *Journal of Food Protection*, 60, 1089-1094.
153. Rowan, N. J., Deans, K., Anderson, J. G., Gemmel, C. G., Hunter I. S., Chaithong, T. 2001. Putative virulence factor expression by clinical and food isolates of *Bacillus* spp. after growth in reconstituted infant milk formulae. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3873-3881.
154. Rowan, N. J., G. Caldow, C. G. Gemmel, and I. S. Hunter. 2003. Production of diarrheal enterotoxins and other potential virulence factors by veterinary isolates of *Bacillus* species associated with nongastrointestinal infections. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2372–2376.
155. Rückert, A, Ronimus, R.S, Morgan, H.W. 2004. A RAPD-based survey of thermophilic bacilli in milk powders from different countries. *International Journal of Food Microbiology*; 96(3): 263- 272.
156. Sadek, Z. I., Abdel-Rahman, M. A., Azab, M. S., Darwesh, O. M., Hassan, M. S. 2018. Microbiological evaluation of infant foods quality and molecular detection of *Bacillus cereus* toxins relating genes. *Toxicology Reports*, 5, 871-877.
157. Sadiq, F. A., Li, Y., Liu, T., Flint, S., Zhang, G., He, G. 2016. A RAPD based study revealing a previously unreported wide range of mesophilic and thermophilic spore formers associated with milk powders in China. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 200–208.
158. Sadiq, F.A., Flint, S., He G-Q. 2018. Microbiota of milk powders and the heat resistance and spoilage potential of aerobic spore-forming bacteria. *International Dairy Journal*, 85, 159 -168.



159. Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-uzalski T., Scoging, A.C. 1999. Toxigenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4637–4645.
160. Scheldeman, P., Herman, L., Foster, S., and Heyndrickx, M. 2006. *Bacillus sporothermodurans* and other highly heat-resistant spore formers in milk. *J. Appl. Microbiol.* 101, 542–555.
161. Scott, S. A, Brooks, J. D., Rakonjac, J., Walker, K. M. R., & Flint, S. H., 2007. The formation of thermophilic spores during the manufacture of the whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 109-17
162. Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101, 514–525.
163. Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. and Ferguson, J. 1989. *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* IO, 3988401.
164. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia., P.K., Viridi, J.S .2015. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* 6:791.
165. Spaulding, M., Welch, P. 1994. *Nurturing Yesterday's Child: A Portrayal of the Drake Collection of Paediatric History*, B C Decker Inc. 352 p.
166. Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E .2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol Rev* 32:579–606.
167. Stevens, E.E., Patrick, T.E., Pickler, R. 2009. A history of infant feeding. *J. Perinat. Educ.* 18(2):32.
168. Tasaki, S., Nakayama, M., Shoji, W. 2017. Morphologies of *Bacillus subtilis* communities responding to environmental variation. *Develop. Growth Differ.* (2017) 59, 369–378.
169. Taylor, J.M., Sutherland, A.D., Aidoo, K.E., Logan, N.A., 2005. Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus egaterium*, *Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 242, 313–317.
170. Townsend, S., Forsythe, S. J. 2008. Chapter 3 : The neonatal intestinal microbial flora, immunity, and infections. *Enterobacter sakazakii*, 61-100.
171. UBIC CONSULTING. 2011. *Ingredients for the World Infant Formula Market*. Available from: [www.ubic-consulting.com](http://www.ubic-consulting.com). Vu le 8 Décembre 2020.

## Références bibliographiques

172. Van Acker, J., De Smet, F., Muyltermans, G., Bougatef, A., Naessens, A., Lauwers, S. 2001. Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobactersakazaki* powdered milk formula. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 293-297.
173. Veysseyre, F., Fourcade, C., Lavigne, J. P., Sotto, A. 2015. *Bacillus cereus* infection: 57 case patients and a literature review. *Médecine et maladies infectieuses*, 45, 436 - 40.
174. Victora, C.G., Bahl, R., Barros, A.J.D., França, G.V.A., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., M. Sankar, M.J., Walker, N., Rollins, N.C. 2016. Breastfeeding in the 21st century: epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *Lancet* 387:475–90
175. Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., Heyndrickx, M. 2020. Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* Spores in Dairy Products. *Biosensors*, 10, 15.
176. Vidic, J., Chaix, C., Manzano, M., Heyndrickx, M. 2020. Food Sensing: Detection of *Bacillus cereus* spores in Dairy Products. *Biosensors*, 10(3):15, doi: 10.3390/bios10030015.
177. Wang, X., Meng, J., Zhang, J., Zhou, T., Zhang, Y., Yang, B., Xi, M., Xia, X. 2012. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from powdered infant formula milk and infant rice cereal in China. *Int J Food Microbiol.* 2012 Feb 1;153(1-2):142-7.
178. Watterson, M. J., Kent, D. J., Boor, K. J., Wiedman, M., Martin, N. H. 2014. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of Dairy Science*, 97, 2487–2497.
179. WHO et FAO. 2004. Workshop on *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula. MRA Series 6. Geneva: World Health Organisation. 2 – 5 February 2004
180. WHO et FAO. 2006. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 10. WHO/FAO, Geneva, Switzerland.
181. WHO et FAO. 2007. Safe Preparation, Storage and Handling of Powdered Infant Formula Guidelines; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2007.
182. WHO et FAO. 2008. *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formula: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 15, Geneva, Switzerland.
183. WHO. 1981. International Code of Marketing of Breast-Milk Substitutes, Resolution WHA 34.22. World Health Organization, Geneva.
184. WHO. 2003. *Global strategy for infant and young child feeding*. Geneva, Switzerland.
185. Witkowska-Zimny, M., Kaminska-El-Hassan, E. 2017. Cells of human breast milk. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 22: 11.

## Références bibliographiques

186. Wu, S., Jiang, Y., Lou, B., Feng, J., Zhou, Y., Guo, L., Forsythe, S., Man, C. 2018. Microbial community structure and distribution in the air of a powdered infant formula factory based on cultivation and high-throughput sequence methods. *Journal of Dairy Science*, 101, 6915-6926.
187. Yang, Y., Yu, X., Zhan, L., Chen, J., Zhang, Y., Zhang, J., Chen, H., Zhang, Z., Zhang, Y., Lu, Y., Mei, L. 2017. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China. *Food Microbiology*, 62, 46 – 50.
188. Yong Yang ,Xiaofeng Yu , Li Zhan , Jiancai Chen , Yunyi Zhang , Zhang, J., Chen, C., Zhang, Z., Zhang., Y., Lu, Y., Meia, L.2017. Multilocus sequence type profiles of *Bacillus cereus* isolates from infant formula in China. *Food Microbiology*. (62) 46-50.
189. Yoo, J.G., Chang, J.H., Kim, S.Y., Ji, J.Y., Hong, S.W., Park, B.Y., Oh, M.H., 2014. Analysis of emetic toxin production by *Bacillus* species using cellular cytotoxicity, molecular, and chromatographic assays. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19, 978–983.
190. Yuan, D.-D., Liu, G.-C., Ren, D.-Y., Zhang, D., Zhao, L., Kan, C.-P., Yang, Y-Z., Ma, W., Li, Y., Zhang, L-B. 2012. A survey on occurrence of thermophilic bacilli in commercial milk powders in China. *Food Control* 25, 752–757. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.12.020.
191. Zain, S.N.M., Flint, S.H., Bennett, R., Tay, H. 2016. Characterisation and biofilm screening of the predominant bacteria isolated from whey protein concentrate 80. *Dairy Sci Technol.* 96 (3), 285-295.
192. Zhao, S., Chen, J., Fei, P., Feng, H., Wang, Y., Ali, M. A., Li, S., Jing, H., Yang, W. 2020. Prevalence, molecular characterization, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from dairy products in China. *Journal of Dairy Science*, 103, (5), 3994-4001
193. ZHOU, X., GAO, J., HUANG, Y., FU, S., CHEN, H. 2011. Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumonia* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 5(19), pp. 3073-3077.
194. Zhuang, K., Li, H., Zhang, Z., Wu, S., Zhang, Y., Fox, E.M., Man, C., Jiang, Y .2019. Typing and evaluating heat resistance of *Bacillus cereus* sensu stricto isolated from the processing environment of powdered infant formula. *Journal of Dairy Science*, 102, 7781-7793.
195. Zink, D. 2003. Contaminants And Natural Toxicants Subcommittee Meeting *Enterobacter akazakii* Contamination In Powdered Infant Formula. Office of Plant and Dairy Foods and Beverages Center for Food Safety and Applied Nutrition Food and Drug Administration. P : 1-3.



# **Annexes**

<b>Annexe I : Les milieux de cultures</b>
---

**Plate Count Agar PCA:** pH = 7.0 ± 0.2

➤ Tryptone	5.0g
➤ Extrait auto lytique de levure	2.5g
➤ Glucose	1.0g
➤ Agar	12.0g

**TSE:**

➤ Tryptone	1.0g
➤ NaCl	8.5g
➤ Eau distillée	1000ml

**BHIB:** pH= 7.4

➤ Protéose-peptone infusion de cervelle de veau	10.0g
➤ Infusion de cœur de bœuf	12.5g
➤ Glucose	5.0g
➤ Chlorure de sodium	2.0g
➤ Hydrogénophosphate de sodium	2.5g
➤ Eau distillé	1000ml

**Viande foie (VF):** pH = 7.4

➤ Base viande foie	30.0g
➤ Glucose	2.0g
➤ Agar	6.0g

**Mannitol mobilité :** PH= 7,6

➤ Hydrolysate tryptique de caséine	10.0g
➤ Mannitol	7.5g
➤ Rouge de phénol	0.4mg
➤ Nitrate de potassium	1.0g
➤ Agar	30.5g

<b>Annexe I : Les milieux de cultures</b>
---

**Mueller Hinton** : pH=7.4

➤ Extrait de viande	2g
➤ Hydrolysate acide de caséine	17.5g
➤ Amidon	1.5g
➤ Agar	15.0

**Gélose au lait** :

➤ Poudre de lait écrémé	5g
➤ Agar	1g
➤ Eau distillé	100ml

**Gélose d'Amidon**:

➤ Gélose nutritive	100ml
➤ Amidon	1g

**Gélose au sang**:

➤ Gélose nutritive	190ml
➤ Sang	5ml

**Milieu pour la recherche de la lécithinase** :

➤ GN	100ml
➤ Jaune d'œuf	8ml

**Annexe II : Détail du dénombrement**

Résultats du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries aérobies sporulées thermophile (BAST) pour la marque PLI-1. La charge exprimée en  $\log_{10}$  UFC/g.

E = Echantillon

1er âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	2,4E+02	2,8E+03	6,8E+02
E2	9,3E+01	1,0E+01	1,5E+01
E3	7,6E+01	1,6E+03	2,7E+03
E4	1,0E+02	1,0E+03	7,4E+02
E5	1,0E+03	1,0E+03	6,9E+02
E6	3,8E+03	2,1E+03	1,7E+03
E7	3,4E+03	1,0E+03	4,5E+02
E8	3,5E+03	1,0E+03	5,0E+02
E9	3,6E+03	1,8E+03	7,5E+02

2ème âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	3,0E+03	2,0E+03	7,0E+02
E2	3,0E+03	3,0E+03	1,0E+02
E3	1,0E+03	2,0E+03	6,0E+02
E4	1,0E+03	3,0E+03	9,0E+01
E5	3,0E+03	2,0E+03	2,0E+02
E6	5,0E+04	1,0E+03	1,1E+02
E7	1,0E+03	3,2E+03	1,6E+02
E8	2,0E+03	1,0E+03	2,0E+02
E9	1,0E+03	3,0E+02	1,1E+02

**Annexe II : Détail du dénombrement**

Résultats du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries aérobies sporulées thermophile (BAST) pour la marque PLI-2. La charge exprimée en  $\log_{10}$  UFC/g.

E = Echantillon

1er âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	1,00E+03	1,0E+03	4,3E+02
E2	2,00E+02	1,0E+02	1,0E+02
E3	1,68E+03	9,8E+02	3,9E+02
E4	1,00E+03	1,0E+03	9,4E+02
E5	3,10E+03	2,9E+03	1,0E+03
E6	9,00E+01	5,0E+01	4,0E+01
E7	1,82E+03	1,0E+03	5,0E+02
E8	7,70E+02	4,0E+02	2,4E+02
E9	2,18E+03	1,0E+03	1,0E+03

2ème âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	1,5E+03	9,4E+02	7,7E+02
E2	9,4E+02	7,6E+02	6,4E+02
E3	3,0E+03	2,0E+03	1,0E+03
E4	1,7E+03	1,0E+03	7,1E+02
E5	2,5E+03	2,1E+03	8,1E+02
E6	4,2E+02	3,7E+03	1,0E+03
E7	2,8E+03	2,2E+03	7,0E+02
E8	2,5E+03	2,1E+03	8,8E+02
E9	3,5E+03	3,1E+03	1,0E+03



**Annexe II : Détail du dénombrement**

Résultats du dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT), les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et les bactéries aérobies sporulées thermophile (BAST) pour la marque PLI-3. La charge exprimée en  $\log_{10}$  UFC/g.

E = Echantillon

1er âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	2,0E+03	2,6E+03	3,9E+02
E2	5,9E+02	1,0E+03	1,4E+02
E3	2,0E+02	1,0E+02	8,0E+01
E4	3,6E+03	3,0E+01	1,2E+02
E5	1,6E+03	9,0E+01	4,0E+01
E6	1,0E+03	2,8E+02	1,5E+02
E7	6,1E+02	8,0E+01	4,0E+01
E8	9,0E+01	8,0E+01	5,0E+01
E9	6,6E+02	7,6E+02	2,0E+02

2ème âge

	FMAT	BASM	BAST
E1	2,0E+03	1,0E+02	3,2E+02
E2	7,0E+02	3,9E+02	1,0E+03
E3	1,0E+03	5,0E+02	1,0E+03
E4	1,0E+03	5,2E+02	1,4E+02
E5	3,7E+03	1,0E+03	7,0E+02
E6	3,5E+03	2,9E+03	4,0E+02
E7	3,2E+02	1,0E+02	7,9E+02
E8	5,0E+02	4,5E+01	6,1E+02
E9	1,0E+04	2,4E+03	3,8E+02

### Annexe III : Le calcul des pourcentages

#### **A total of strains that contain toxin genes = 44.**

The number of *B. cereus* that contains toxin genes = 25. So  $(25/44)*100 = 56.8\%$ .

The number of *B. licheniformis* that contains toxin genes = 15. So  $(15/44)*100 = 34\%$ .

The number of *B. subtilis* that contains toxin genes = 02. So  $(2/44)*100 = 4.5\%$ .

The number of *B. pumilus* that contains toxin genes = 01. So  $(1/44)*100 = 2.3\%$ .

The number of *Lysinibacillus sphaericus* that contains toxin genes = 01. So  $(1/44)*100 = 2.3\%$ .

#### **% of Nhe for *B. cereus*:**

A total of *B. cereus* that contains toxin genes = 25.

A total of *B. cereus* that contains *NheA* = 18. So  $(18/25)*100 = 72\%$

A total of *B. cereus* that contains *NheB* = 18. So  $(18/25)*100 = 72\%$

A total of *B. cereus* that contains *NheC* = 01. So  $(1/25)*100 = 4\%$

#### **% of Hbl for *B. cereus*:**

*B. cereus* isolates harboured at least one component of the *hbl* gene = 7. So  $(7/25)*100 = 28\%$

A total of *B. cereus* that contains *HblA* = 06. So  $(6/25)*100 = 24\%$

A total of *B. cereus* that contains *HblB* = 06. So  $(6/25)*100 = 24\%$

A total of *B. cereus* that contains *HblC* = 07. So  $(7/25)*100 = 28\%$

A total of *B. cereus* that contains *Hbl (ABC)* gene cluster = 06. A total of *B. cereus* isolated = 40. So  $(6/40)*100 = 15\%$

#### **% of *cytK* for *B. cereus*:**

A total of *B. cereus* that contains *cytK* = 11. So  $(11/25)*100 = 44\%$

#### **% of *bceT* for *B. cereus*:**

A total of *B. cereus* that contains *bceT* = 08. So  $(8/25)*100 = 32\%$

#### **% of *entFM* for *B. cereus*:**

A total of *B. cereus* that contains *entFM* = 15. So  $(15/25)*100 = 60\%$

#### **% of number toxin genes per strain of *B. cereus*:**

A total of *B. cereus* harboured 6-7 toxin genes = 07. So  $(7/25)*100 = 28\%$

A total of *B. cereus* harboured 2-4 toxin genes = 11. So  $(11/25)*100 = 44\%$

A total of *B. cereus* harboured one toxin gene = 07. So  $(7/25)*100 = 28\%$

A total of *B. cereus* harboured toxin genes isolated from second age PIF = 14. So  $(14/25)*100 = 56\%$

#### **% of toxin genes for a strains of *B. subtilis* group :**

A total of 68 strains belonged to the *B. subtilis* group were isolated from PIF samples.

A total of *B. licheniformis* positive for *Nhe* = 12. So  $(12/68)*100 = 17.6\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *NheA* = 03. So  $(3/68)*100 = 4.5\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *NheB* = 10. So  $(10/68)*100 = 14.7\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *NheC* = 01. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *Hbl* = 02. So  $(2/68)*100 = 2.9\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *cytK* = 02. So  $(2/68)*100 = 2.9\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *bceT* = 01. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

A total of *B. licheniformis* positive for *entFM* = 01. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

A total of *B. subtilis* positive for *NheB* = 01. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

A total of *B. subtilis* positive for *entFM* = 01. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

A total of *B. pumilus* positive for *Hbl* = 02. So  $(1/68)*100 = 1.5\%$

<b>Annexe IV : PLS Regression</b>
-----------------------------------

XLSTAT 2020.1.2.64970 - PLS Regression -

Y / Qualitative: Workbook = ANALYSISDA (1).xlsx / Sheet = LDA / Range = LDA!\$C\$3:\$C\$9 / 6 rows and 1 column

X / Quantitative: Workbook = ANALYSISDA (1).xlsx / Sheet = LDA / Range = 'LDA'!\$E\$3:\$M\$9 / 6 rows and 9 columns

Method: PLS discriminant analysis

Model quality:

Statistic	Comp1	Comp2
Q <sup>2</sup> cum	0,241	0,638
R <sup>2</sup> Y cum	0,448	0,921
R <sup>2</sup> X cum	0,532	0,697

**Summary**

**statistics:**

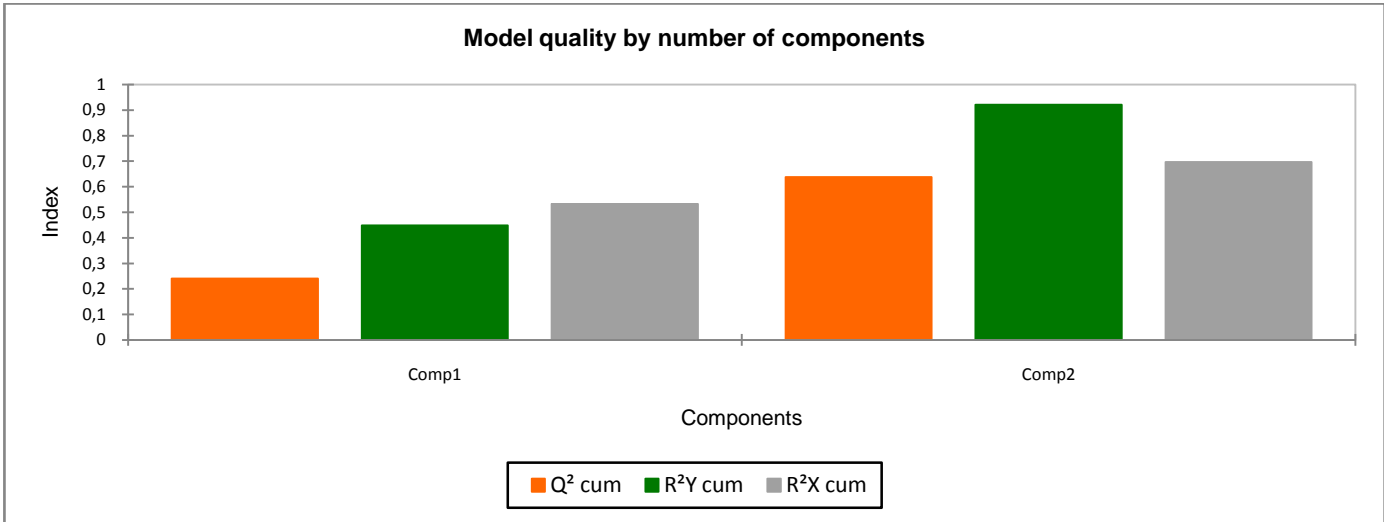
Variable	Categories	Frequencies	%
	A	2	33,333
	B	2	33,333
	C	2	33,333

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. de
blA	6	0	6	0,000	3,000	1,000	
blB	6	0	6	0,000	3,000	1,000	
blC	6	0	6	0,000	3,000	1,667	
heA	6	0	6	3,000	5,000	3,500	
heB	6	0	6	1,000	8,000	5,000	
heC	6	0	6	0,000	1,000	0,333	
ytK	6	0	6	1,000	3,000	2,167	
ect	6	0	6	0,000	3,000	1,500	
ntFM	6	0	6	1,000	4,000	2,833	

Correlation matrix:

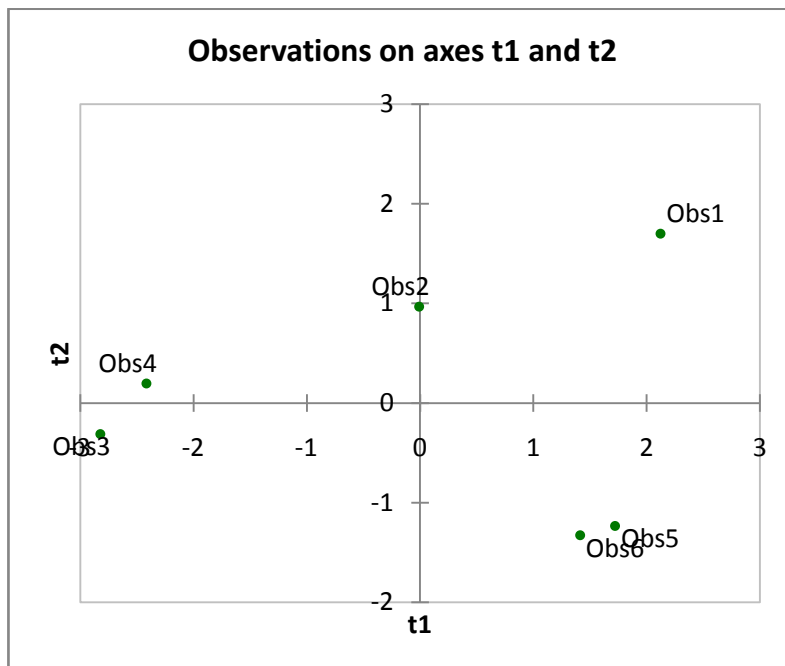
Variables	BC hblA	BC hblB	BC hblC	BC nheA	BC nheB	BC nheC	BC CytK	BC bect	BC entFM	A	B	C
BC hblA	<b>1,000</b>	1,000	0,694	0,378	0,624	-0,612	0,322	0,775	0,271	0,306	-0,612	0,306
BC hblB	1,000	<b>1,000</b>	0,694	0,378	0,624	-0,612	0,322	0,775	0,271	0,306	-0,612	0,306
BC hblC	0,694	0,694	<b>1,000</b>	0,350	0,706	-0,378	0,794	0,956	-0,167	0,472	-0,945	0,472
BC nheA	0,378	0,378	0,350	<b>1,000</b>	0,000	-0,463	0,608	0,293	-0,307	-0,463	-0,463	0,926
BC nheB	0,624	0,624	0,706	0,000	<b>1,000</b>	0,170	0,446	0,788	-0,075	0,679	-0,679	0,000
BC nheC	-0,612	-0,612	-0,378	-0,463	0,170	<b>1,000</b>	-0,131	-0,316	-0,221	0,250	0,250	-0,500
BC CytK	0,322	0,322	0,794	0,608	0,446	-0,131	<b>1,000</b>	0,747	-0,319	0,263	-0,919	0,657
BC bect	0,775	0,775	0,956	0,293	0,788	-0,316	0,747	<b>1,000</b>	0,070	0,632	-0,949	0,316
BC entFM	0,271	0,271	-0,167	-0,307	-0,075	-0,221	-0,319	0,070	<b>1,000</b>	0,442	0,110	-0,552
A	0,306	0,306	0,472	-0,463	0,679	0,250	0,263	0,632	0,442	<b>1,000</b>	-0,500	-0,500
B	-0,612	-0,612	-0,945	-0,463	-0,679	0,250	-0,919	-0,949	0,110	-0,500	<b>1,000</b>	-0,500
C	0,306	0,306	0,472	0,926	0,000	-0,500	0,657	0,316	-0,552	-0,500	-0,500	<b>1,000</b>

**Annexe IV : PLS Regression**



Scores on t:

Observation	t1	t2
Obs1	2,120	1,701
Obs2	-0,010	0,970
Obs3	-2,824	-0,311
Obs4	-2,418	0,199
Obs5	1,721	-1,234
Obs6	1,410	-1,327



## ملخص

الحرارية بين 2 و 3  $\log_{10}$  ufc/g من جهة أخرى، و 13% و 50% و 37% من العينات كان لديها تعداد البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ أقل من  $\log_{10}$  2 ufc/g، بين 2-3  $\log_{10}$  ufc/g وبين 3-4  $\log_{10}$  ufc/g، على التوالي. وكان 97% لديها بروتياز، 84% أميلاز، 66% كان لها نشاط انحلالي للدم، و 61% كان لديها نشاط ليسيثيناز. 44 من أصل 120 عرلة تحتوي على جين سام واحد على الأقل، حيث احتوت *B. cereus* على 56%، *licheniformis* و 34% وأقل من 5% لكل من *B. subtilis* و *B. pumilus* و *L. sphaericus*. حملت جميع عزلات *B. cereus* الجين *entFM*، 60%، 44% *cytK*، 32% و *hbl* و 28%. بالإضافة إلى ذلك، فإن 17% من بكتيريا *B. licheniformis* احتوت على بعض هذه الجينات السامة. كانت نسبة صغيرة من بكتيريا *B. subtilis* و *B. pumilus* و *L. sphaericus* تحمل جينات سامة أيضا. قدمت شجرة النشوء والتطور القائمة على *rpoB* دقة عالية بين أنواع البكتيريا الهوائية المكونة للأبواغ. تقدم نتائج هذه الدراسة نظرة واسعة للتنوع البيولوجي الظاهري والجيني للعصيات الموجودة في حليب الأطفال المجفف الذي يباع في الجزائر.

**الكلمات المفتاحية:** جراثيم العصيات؛ مسحوق حليب أطفال؛ جينات التسمم؛ بانيباسيلوس؛ باسيلوس

## Résumé

Le lait maternel est la meilleure source de nutriments pour les nouveau-nés et les nourrissons, cependant, lorsqu'il n'est pas suffisant ou disponible, les parents ont recours la poudre de lait infantile (PLI). Cette étude visait à évaluer le dénombrement et la caractérisation de la biodiversité des bactéries aérobies sporulées (BAS) dans la PLI. Cinquante-quatre (n = 54) échantillons de PLI de trois marques ont été analysés pour les bactéries aérobies mésophiles (FMAT) et les BAS. Les BAS isolées à partir de la PLI ont été évaluées pour leurs capacités à produire des enzymes de détérioration et une activité hémolytique, puis identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Ensuite, les isolats ont été soumis au typage du gène *rpoB* et à l'évaluation des gènes de toxine *bceT*, *entFM*, *nhe* (A, B, C) et *hbl* (A, B, C). Les principales espèces isolées étaient *B. licheniformis* (54 %), suivi de *B. cereus* (33 %) et *B. subtilis* (5 %). La charge des BAS variaient de 1 à 4  $\log$  ufc/g, et la moyenne était de 2,9  $\log$  ufc/g pour les bactéries aérobies sporulées mésophiles (BASM) et de 2,5  $\log$  ufc/g pour les bactéries aérobies sporulées thermophiles (BAST).

**Mots clés:** Spores; préparations pour nourrissons; gènes de toxines; *Bacillus*; *Paenibacillus*.

## Abstract

Breast milk is the best source of nutrients for newborns and infant, however, when breastfeeding is not sufficient or possible, parents feed them by powdered infant formula (PIF). This study aimed to assess the counts and biodiversity characterization of aerobic sporeforming bacteria (ASB) in powdered infant formula (PIF). Fifty-four (n=54) samples of PIF of three brands were analyzed for mesophilic aerobic bacteria, and ASB counts. ASB isolated from PIF were assessed for their ability to produce spoilage enzymes and hemolytic activity and further identified by MALDI-TOF mass spectrometry. Then, the isolates were subjected to *rpoB* gene typing and assessment of *bceT*, *entFM*, *nhe* (A, B, C), and *hbl* (A, B, C) toxin genes. The main species isolated were *B. licheniformis* (54%), followed by *B. cereus* (33%) and *B. subtilis* (5%). The ASB counts ranged from 1 to 4  $\log$  cfu/g, and the mean was 2.9  $\log$  cfu/g for mesophilic aerobic sporeforming bacteria (MSC) and 2.5  $\log$  ufc/g for thermophilic aerobic sporeforming bacteria (TSC). Most PIF

samples presented MSC and TSC counts between 2 and 3  $\log$  ufc/g. A total of 13%, 50%, and 37% of the samples presented MSC counts from <2  $\log$  cfu/g, between 2-3  $\log$  cfu/g and between 3-4  $\log$  cfu/g, respectively. Among the ASB isolates, 97% had protease, 84% hydrolyzed starch, 66% had hemolytic activity, and 61% had lecithinase activity. 44 from 120 isolates harbored at least one toxin gene; 56% for *B. cereus*, 34% for *B. licheniformis*, and less than 5% for *B. subtilis*, *B. pumilus*, and *L. sphaericus*. All *B. cereus* isolates harbored the *nhe* gene, 60% *entFM*, 44% *cytK*, 32% *bceT*, and 28% *hbl* genes. Besides, 17% of *B. licheniformis* harbored *nhe*. A small proportion of *B. subtilis*, *B. pumilus*, and *L. Sphaericus* carried toxin genes. The *rpoB* based phylogenetic tree provided high resolution among *Bacillus* species. The findings of this study provide insights into the phenotypic and genotypic biodiversity of *Bacillus* present in PIF marketed in Algeria.

**Keywords:** Sporeformers; infant formula; toxin genes; *Bacillus*; *Paenibacillus*.