

Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Faculté des Sciences et Techniques - Fès

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques

«Bioprocédés, Hygiène & sécurité alimentaires»

Titre

**« Staphylocoques dans les fromages: cas particulier
des fromages à pâte molle et à pâte dure »**

Présenté par : SEYAR Samia.

Encadré par :

- Mme. : El HABIB Fatima.
- Mr. : HAGGOURD Abdellatif.

Soutenu le : 16/06/2015.

Devant le jury composé de :

- Mr. : HAGGOURD Abdellatif.
- Mr. : EL HARCHI Hassan.

Année universitaire

2014/2015

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

*Toute ma famille spécialement à mes chers
parents qui ont beaucoup sacrifiés pour que je
sois à ce niveau.*

Tout mes ami(e)s

Tous mes collègues de la promotion 2015

*Tous mes professeurs du département de
biologie au sein de la faculté de sciences et
techniques de Fès.*

Remerciement

Je tiens à exprimer en premier, ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à la direction générale de l'institut nationale d'hygiène qui m'a donné l'occasion d'y effectuer mon stage.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent également à Monsieur HAGGOND Abdellatif, Professeur à faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour avoir accepté d'encadrer ce modeste travail.

Ainsi, Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toute l'équipe du laboratoire MHA de microbiologie et hygiène alimentaire pour leurs conseils fructueux, spécialement Madame EL HABIB Fatima, Pour la confiance qu'elle m'a accordée durant la période du stage, pour ses encouragements et pour son aide précieux durant la réalisation de ce travail.

Je remercie également le professeur Monsieur EL HARCHI Hassan d'avoir accepté de juger ce travail.

Des remerciements particuliers s'adressent à notre responsable de filière à la faculté des sciences et techniques de Fès Monsieur ARAB Lotfi pour son soutien continu.

Enfin, Je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail, qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère gratitude.

Résumé :

Des échantillons de fromage reçus au laboratoire d'une façon hebdomadaire sont analysés le plus tôt possible dès leur réception.

On commence par faire l'ensemencement sur le milieu gélosé Baird Parker puis on fait le dénombrement et on passe ensuite aux tests confirmatifs pour les souches suspectes d'être des staphylococcus aureus ; ces tests sont : le test coagulase; le test latex et la galerie api classique et rapide.

Sur les 30 échantillons analysés on a trouvé les staphylocoques justes dans 13 échantillons soit 43,33% les types les plus fréquents trouvés sont :

- S. warneri représentant le plus grand pourcentage égale à 16,66%.*
- S. auricularis à une valeur de 6,66%.*
- S. saprophyticus à un pourcentage de 13,32%.*
- S. xylosus à une valeur de 6,66%.*

Sommaire

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION 1

LES OBJECTIFS DU PRESENT TRAVAIL 2

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

GENERALITES 5

☐ DEFINITION DU FROMAGE : 5

☐ FABRICATION : 5

☐ DEFINITION DU LAIT 7

A-COMPOSITION CHIMIQUE 7

B-COMPOSITION MICROBIOLOGIQUE 7

MICROORGANISMES RESPONSABLES DE TIAC 7

☐ *E. COLI* 7

☐ *LISTERIA MONOCYTOGENES* 8

☐ *SALMONELLA* 8

☐ *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* 8

☐ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* 9

MATERIEL ET METHODES..... 10

ECHANTILLONNAGE 10

MODE OPERATOIRE..... 10

A-PESEE 10

B-DILUTION 10

C-BROYAGE..... 10

D-TECHNIQUE D'ISOLEMENT ET DE DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES..... 10

o Ensemencement et incubation..... 10

o Dénombrement..... 11

o Test confirmatif..... 11

☐ **Coagulase**..... 11

☐ **Latex** 12

☐ **Api rapide**..... 15

RESULTATS 16

CONCLUSION : 17

RECOMMANDATIONS : 18

BIBLIOGRAPHIE : 19

ANNEXES : 20

Liste des figures

FIGURE 1:HOMOGENEISATEUR.....	10
FIGURE 2: COLONIES NOIRES AVEC HALO CLAIR SUR LE MILIEU GELOSE SELECTIF BAIRD PARKER.....	11
FIGURE 3: APPAREIL UTILISE POUR LE DENOMBREMENT	11
FIGURE 4: ENSEMENCEMENT DES COLONIES PRELEVEES DANS DES TUBES DE BHI	12
FIGURE 5: TEST LATEX	13
FIGURE 6: TEST API RAPIDE	15

Liste des tableaux

TABLERAU 1: RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES STAPHYLOCOQUES DANS DIFFERENTS TYPES DE FROMAGE.....	17
--	----

Introduction :

Les microorganismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer des modifications organoleptiques, altérer les qualités marchandes des produits ou constituer un danger pour la santé publique, en raison de leur pouvoir pathogène pour l'Homme. L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de la contamination des denrées alimentaires et de la nature de leur microflore. Il est très largement utilisé, dans le cadre du contrôle officiel et des autocontrôles mis en œuvre par les industriels, pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent ^[1].

La mise en place progressive des principes de l'assurance sécurité dans l'ensemble de l'industrie agroalimentaire et l'évolution récente du cadre réglementaire conduisent, cependant, à s'interroger sur l'intérêt réel des examens microbiologiques des aliments. Il s'avère nécessaire de prendre en compte les principes des techniques de tels examens et les limites de leur emploi, pour optimiser leur utilisation dans ce contexte et parvenir à garantir la protection de la santé du consommateur ^[2].

La sécurité alimentaire, dont la qualité microbiologique des aliments en est une composante essentielle, représente un enjeu considérable. Sur le plan du commerce international, la sécurité alimentaire a un rôle évident à jouer, dans la prévention des maladies d'origine alimentaire et, par voie de conséquence, elle participe à la maîtrise des dépenses de santé ^[1].

La maîtrise des risques microbiologiques repose sur le respect des règles d'hygiène, tout au long des filières de production, de transformation et de distribution et sur la validation des pratiques industrielles, par l'analyse du produit fini.

La sécurité alimentaire n'étant pas négociable et l'exigence d'innocuité microbiologique toujours plus forte, la parfaite maîtrise de la contamination est indispensable.

Elle repose sur une bonne connaissance du monde microbien et fait appel au génie des procédés, pour prendre en compte et maîtriser les phénomènes microbiens de façon très rigoureuse et à chaque étape de la production, ceci, de la matière première à la distribution ^[2].

En effet, par rapport aux autres agents de contamination chimique ou particulière, les microorganismes ont une propriété importante et remarquable, car ils sont capables de se reproduire, surtout, lorsque les conditions sont favorables à cette reproduction, ce qui est souvent le cas pour les microorganismes des produits naturels et alimentaires ^[2].

Ainsi, pour de telles raisons, les microbiologistes s'intéressent aux aliments, et, principalement, pour quatre d'entre elles :

- Pour des raisons économiques, puisque, pendant leur fabrication et/ou leur stockage, les aliments sont altérés par l'oxydation, l'action des enzymes qui y sont présents et par des microorganismes (bactéries, virus, parasites, champignons, invertébrés..) qui s'y multiplient et les rendent impropres à la consommation. En effet, l'altération microbienne est la plus fréquente, car tous les aliments sont des substrats éventuels pour les microbes. Il est donc nécessaire de suivre la qualité microbiologique des aliments :
- pour éviter des pertes de production, pour les industriels, ou une mauvaise publicité, lors d'intoxications alimentaires.

- Pour des raisons de santé publique, puisque les aliments peuvent devenir toxiques, sous l'action de certains microorganismes, ce qui aura donc des conséquences sur la santé des consommateurs. En effet, la qualité microbiologique des aliments est donc surveillée par des organismes compétents, afin d'éviter des intoxications alimentaires.
- Pour respecter la législation, car diverses lois imposent des contrôles réglementés.
- Pour le suivi ou la sélection de « microbes utiles », dans le cas de processus industriels, pour leur utilisation, dans la production d'aliments (yoghourt, fromage, pain, ...) ^[3].

Les objectifs du présent travail sont :

Lors de mon travail je vais pouvoir chercher des staphylocoques spp à partir des échantillons du fromage reçus, faire l'isolement des souches, leurs dénombrement et identifications biochimiques des souches isolées et tests confirmatifs.

Présentation de l'institut d'accueil :

L'Institut d'Hygiène du Maroc inauguré le 30 décembre 1930. Plateforme scientifique et technique de sécurité sanitaire ; Organe de référence en matière de biologie médicale et environnementale.

Institut étatique, l'Institut National d'Hygiène (INH) prend en charge des problèmes d'hygiène et d'épidémiologie au Maroc. Son champ d'intervention est très vaste et ses laboratoires jouent le rôle de supports technique et scientifique aux différents programmes sanitaires tels que la tuberculose, le paludisme, la bilharziose, les leishmanioses, les méningites, les maladies entériques, le choléra, les salmonelloses, les infections sexuellement transmissibles, l'infection VIH, la poliomyélite, la rougeole et la grippe.

L'INH se compose de neuf Départements tels que Génétique Médicale, Bactériologie Médicale, Immunologie et Virologie, Parasitologie et Mycologie, Biochimie et Hématologie, Anatomopathologie, Microbiologie et Hygiène Alimentaire, Toxicologie et Hydrologie et le Service du Bureau des Laboratoires.

Activités de l'INH :

- Assurer l'appui technique et scientifique des différents programmes de santé publique.
- Participer à la surveillance, à la veille et à la sécurité sanitaire.
- Animer le réseau national des laboratoires de santé publique.
- Assurer des prestations de services dans le domaine de biologie médicale.
- Assurer des prestations de services dans le domaine de Santé-environnement.
- Formation, recherches et partenariat.

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE ET HYGIÈNE ALIMENTAIRE :

Le Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire (MHA) de l'Institut National d'Hygiène (INH) constitue le laboratoire national de référence, pour le Ministère de la Santé, et reste l'un des piliers des enquêtes épidémiologiques menées par le Ministère de la Santé.

Les principales missions du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire (MHA) sont d'assurer et de mener à bien toutes les analyses microbiologiques des eaux et des denrées alimentaires, aussi bien pour les services publiques que pour le secteur privé et de former les techniciens des laboratoires.

Missions du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire :

L'une des missions principales du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire (MHA) est le renforcement du système d'épidémiologie surveillance des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), par l'introduction de nouvelles techniques spécialisées et d'une méthodologie d'études au laboratoire qui

fournira une information exacte et utile pour lutter contre l'épidémie, tout en accordant une place importante à la coordination des activités du microbiologiste et de l'épidémiologiste.

Le souci primordial du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire (MHA) est l'élargissement de l'éventail des prestations en bactériologie alimentaire, par l'introduction d'analyses spécialisées à visée diagnostique, afin de prendre en charge les microorganismes des maladies ré émergentes. Ainsi, par la création d'unités de référence telles que l'unité de référence de *Listeria monocytogènes*, l'unité de *Clostridium botulinum*, l'unité de *Campylobacter Coli*, l'unité de *Legionella*, ..., le Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire (MHA) se veut être performant.

Activités du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire :

Le Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire effectue les analyses microbiologiques des denrées alimentaires de toutes catégories, des eaux de toutes natures, des échantillons de l'environnement quel que soit leur origine, des produits cosmétiques, des désinfectants ..., selon des critères, des normes et des réglementations nationaux et internationaux en vigueur.

Etude bibliographique :

Généralités

• Définition du fromage :

Le fromage est un aliment obtenu à partir de lait coagulé ou de produits laitiers, comme la crème, puis d'un égouttage suivi ou non de fermentation et éventuellement d'affinage (fromages affinés). Le fromage est fabriqué à partir de lait de vache principalement, mais aussi de brebis, de chèvre, de bufflonne ou d'autres mammifères. Le lait est acidifié, généralement à l'aide d'une culture bactérienne. Une enzyme, la présure, ou un substitut comme de l'acide acétique ou du vinaigre, est ensuite adjointe afin de provoquer la coagulation et former le lait caillé et le petit-lait. Certains fromages comportent de la moisissure, sur la croûte externe et/ou à l'intérieur, et même des larves vivantes dans certaines régions.

• Fabrication :

- **La pasteurisation :** est une technique qui vise à débarrasser le lait de certains micro-organismes indésirables et augmenter la DLC. Le lait est ainsi chauffé pendant 15 secondes à 72°C entre deux plaques chauffantes.
- **Le caillage :** est l'une des étapes essentielles de la fabrication des fromages. Le but est de laisser le lait coaguler grâce à l'action de la présure (enzyme issue de l'estomac du jeune veau nourri exclusivement au lait) et de ferments lactiques ou un procédé « végétal » : du suc de figue ou par acidification naturelle de ses propres ferments. Le lait passe alors de l'état liquide à l'état solide. A température ambiante, le caillage du lait s'effectue naturellement. La quantité de ferments lactiques pourra ainsi changer selon le type de fromage souhaité à l'arrivée.

Pour certains fromages, on aura apporté un traitement thermique au lait suivant le fromage voulu :

-Fromage frais et chèvres : caillage lactique, sans ajout de présure.

-Fromage à pâtes pressées cuites : prédominance présure.

-Pâtes molles ou persillées: caillage mixte : ferments lactique et présure.

- **L'égouttage :** Comme l'étape précédente, l'égouttage du fromage diffère selon les familles. Pour les caillés lactiques : l'égouttage du fromage est spontané (facteur biologique). Le lait est maintenu pendant quelques heures (de 12h à 48h) à une température avoisinant les 15°C. Les ferments se développent et produisent de l'acidité. L'acide lactique déminéralise alors le caillé en lui enlevant une grande partie de son calcium et de sa souplesse. On obtient alors un caillé « lactique », d'une grande porosité qui s'égoutte lentement et spontanément.
 - Pour les pâtes molles (Camembert, Munster...), le caillé est uniquement découpé.
 - Pour les pâtes pressées, on utilise le découpage et le brassage afin de mieux éliminer l'eau. On peut utiliser aussi le chauffage ou le pressage. L'élimination de l'eau implique une concentration plus élevée du lait.
 - Pour les pâtes persillées (Roquefort, Bleu des causses...) le caillé est découpé et brassé.

On peut le faire soit mécaniquement, en utilisant une presse, soit naturellement en laissant le caillé dans un linge et laisser son propre poids exercer la pression. Ce stade de la fabrication permet d'évacuer la proportion d'eau encore en trop dans le caillé. Selon le type de fromage, on pressera plus ou moins longtemps et fortement.

- **Le moulage :** le caillé est placé dans différents moules selon la forme du fromage souhaité. On définit aussi sa forme son poids et ainsi l'incidence sur son affinage. C'est à ce moment qu'on lui donne une reconnaissance visuelle.

Il existe quatre grands types de moulage :

Le moulage à la louche ou à la poche :

*Pour les caillés fragiles (lactiques).

*Pour certaines pâtes molles (Camembert, Brie).

Le moulage par retournement :

*Pour les caillés à coagulation lente.

*Pour les caillés fragiles.

Le moulage par répartition :

*Plus rapide et plus brutale.

*Pour les pâtes molles à coagulation mixte moins fragile.

Le moulage par dosage :

* Pour des caillés très égouttés comme le Roquefort.

* Pour des fromages type Camembert ou les pâtes pressées.

* L'usage des mouleuses-doseuses ne nécessite pas de manipulation humaine.

- **Le pressage :** Cette étape est une prolongation de l'égouttage. Pour certains fromages, il convient d'égoutter le fromage plus fortement; en le plaçant sous une presse on extrait d'avantage l'eau permettant une plus grande possibilité de garde. Le cas des fromages de grandes tailles, type Comté, Beaufort, Etivaz, est typique de cette étape. La pâte est plus sèche et la conservation meilleure.
- **Le salage :** Le sel est un élément indissociable de la fabrication, il agit en exhausteur de goût, en conservateur, et sa concentration aura un effet sur la souplesse du fromage. Le sel est ajouté à différents moments de la fabrication du fromage, jusqu'à l'affinage. Il a une incidence sur le goût, la texture et l'aspect du fromage (La croûte). Les propriétés du sel permettent au fromage de lutter contre les microbes et les bactéries. Le salage peut être effectué aussi par trempage dans un bain de saumure. Le fromage peut être salé de deux façons : la première, dit "salage à sec" en le saupoudrant de sel, et la deuxième, dite "par immersion", en l'immergeant dans un bain de saumure saturée.
 - Le salage du fromage se déroule dans les 24h qui suivent le démoulage des pâtes molles.
 - Pour les pâtes pressées cuites et non cuites, le salage du fromage est lent et progressif, afin d'obtenir une maturation plus longue.
- **L'affinage :** Une fois fabriqués tous les fromages démarrent la phase de l'affinage afin d'acquérir leur texture définitive et développer leurs arômes et leurs saveurs. Plusieurs phénomènes vont se produire pendant l'affinage du fromage. Le sel va migrer dans la pâte, la croûte va se transformer peu à peu, la caséine va engendrer une saveur et une texture particulière à chaque fromage. Le truchement du lait provoque le déclenchement de l'affinage du fromage. Les ferments naturels déclenchent ensuite l'éclosion des saveurs de chaque fromage. Enfin les champignons et les bactéries vont

terminer le processus de l'affinage du fromage.

La durée de l'affinage d'un fromage diffère selon les familles et les produits. Certains sont affinés pendant quelques jours, d'autres peuvent l'être pendant des mois, voir des années. Les pâtes molles s'affinent de l'extérieur vers l'intérieur car leur flore de surface est active. Le moelleux paraissant d'abord à l'extérieur. La durée de l'affinage du fromage est estimée entre 4 et 12 semaines.

Les pâtes pressées ne s'affinent que de l'intérieur, c'est pourquoi leurs croûtes sont sèches. Ils s'affinent entre 9 et 24 mois.

- **Définition du Lait**

Le lait est un liquide biologique comestible produit par les glandes mammaires des mammifères femelles. Il est opaque, de couleur généralement blanchâtre ou jaunâtre selon la teneur en β -carotène de la matière grasse, il a une odeur peu marquée mais reconnaissable et une saveur douce.

A-Composition chimique

Le lait de vache à une densité moyenne égale à 1,032, c'est un mélange très complexe et très instable. Il contient :

- ~ Une forte proportion d'eau environ 87 %. Les lipides ou matières grasses (M.G).
- ~ Les protides ou matières azotées, les glucides ou sucres et les sels minéraux.
- ~ Les lipides, protides, glucides et les sels minéraux constituent l'extrait sec total (E.S.T).
- ~ Les protides, les glucides et les sels minéraux constituent l'extrait sec Dégraissée (E.S.D).

B-Composition microbiologique

Tout lait normal, quand il sort de la glande mammaire des femelles des mammifères comporte des microbes (de 10 000 à 500 000 par ml) qui sont d'origine et de nature très variées. Certaines sont endogènes, d'autres proviennent de l'environnement (contamination du lait par des germes des poussières, matériels de traite et de collecte ainsi que par ceux des animaux et même de l'homme).

Le lait est un excellent milieu de culture à température ambiante, les germes s'y multiplient très rapidement. Certaines espèces nuisent à une bonne consommation, mais sont utiles car elles conditionnent les transformations en yaourts, beurre ou fromages.

D'autres sont essentiellement nuisibles, soit à cause de leur rôle dans la décomposition du lait, soit parce qu'elles sont pathogènes.

Microorganismes responsables de TIAC

Les toxi-infections alimentaires sont des maladies contractées en consommant des aliments dans lesquels les germes pathogènes présents se sont par la suite multipliés dans le contenu intestinal. Les intoxications sont provoquées par l'ingestion d'aliments contenant une ou des toxines, produites par des micro-organismes pathogènes.

- ***E. coli***

E. coli est un hôte normal de l'intestin de l'homme. Certains types d'*Escherichia coli* peuvent provoquer des troubles digestifs : ce sont les *Escherichia coli* entéropathogènes. Leur implication a été démontrée dans certaines gastro-entérites, notamment dans les diarrhées infantiles et dans la "diarrhée des voyageurs" ou « turista ».

Si les *Escherichia coli* des diarrhées infantiles (*Escherichia coli* G.E.I.) étaient bien connus depuis 1940, ce n'est qu'une trentaine d'années plus tard qu'ils seront reconnus responsables de diarrhées sévères et de toxi-infections chez l'homme. Deux types de souches sont actuellement décrites : d'une part des souches entérotoxigènes capables d'excréter soit une entérotoxine thermostable, soit une entérotoxine thermolabile ; ces germes doivent, pour manifester leur pouvoir pathogène posséder des structures d'adhérence de type pili dont la production est codée par une plasmide (CFA I et II). D'autre part, il existe des souches invasives provoquant des diarrhées aiguës, avec fièvre, myalgies et frissons.

E. coli O157:H7 isolé à partir de nombreux produits alimentaires provoque une colite hémorragique sévère. Cet *E. coli* vérotoxigène a été trouvé dans la viande mal cuite et certains produits laitiers.

- ***Listeria monocytogenes***

La listériose invasive: divisée en deux grands groupes d'infection, celles du nouveau-né et de la femme enceinte. Ces deux cas représentent les principales formes cliniques ^[4]. La listériose non invasive: est essentiellement constituée par des cas de gastroentérite qui affiche des symptômes, tels que diarrhée, fièvre, céphalées et myalgie, après une brève période d'incubation. Ces poussées correspondent à l'ingestion de fortes doses ($>10^3$ UFC/g) de *Listeria monocytogenes* par des individus en bonne santé, pour lesquelles toutes les classes d'âges semblent pouvoir être atteintes ^[5].

Les formes les plus graves sont les formes invasives.

L'infection du système nerveux central: La listériose neuro-méningée est une méningo-encéphalite lympho-monocytaire ou purulente, avec fièvre, céphalées, raideur de la nuque, parfois des paralysies des nerfs crâniens (rhombencéphalites), on parle d'une neurolisteriose ^[6].

- ***Salmonella***

Bactéries pouvant être à l'origine de TIAC très graves ; présentes dans le tube digestif des animaux et de l'homme (malades ou porteurs sains) ; elles sont détruites par la cuisson.

La salmonellose est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes et les plus répandues, dont l'agent causal est la bactérie *Salmonella*. *Salmonella* est une bactérie omniprésente et résistante, qui peut survivre plusieurs semaines dans un environnement sec, et plusieurs mois dans l'eau.

Ces souches provoquent classiquement des gastro-entérites, qui sont souvent simples et guérissent sans traitement, mais qui peuvent devenir graves chez les enfants, les personnes âgées, et les patients dont les défenses immunitaires sont affaiblies. On trouve dans ce groupe *Salmonella enteritidis* et *Salmonella typhimurium*, les deux principaux sérotypes de salmonellose transmise de l'animal à l'homme dans la plupart des régions du monde ^[7].

Les symptômes apparaissent 6 à 72 heures (généralement 12 à 36 heures) après l'ingestion de salmonelles, et l'affection dure 2 à 7 jours. Ils sont relativement bénins, et dans la majorité des cas, les patients guériront sans traitement particulier. Cependant, dans certains cas, notamment chez les très jeunes enfants et les personnes âgées, la déshydratation associée peut devenir grave et menacer la vie du sujet.

Bien que les grandes flambées épidémiques de *salmonellose* attirent généralement l'attention des médias, 60 à 80% des cas de salmonellose ne sont pas reconnus comme faisant partie d'une flambée connue et sont classés comme des cas sporadiques, ou ne sont pas diagnostiqués du tout comme tels ^[7].

- ***Clostridium perfringens***

Selon les principales toxines produites, les souches de *C. perfringens* sont classiquement classées en cinq toxinotypes (Type A à E). L'entérotoxine peut être produite par des souches de type A, mais aussi pas des souches d'autre type.

Contrairement aux spores, l'enterotoxine est thermolabile ; elle est détruite en solution saline par un chauffage de 5 minutes à 60°C.

Les symptômes apparaissent entre 6 et 24 heures, généralement 10 à 12 heures, après l'ingestion du repas contaminé. Ils se traduisent surtout par de la diarrhée et de violents maux de ventre, parfois de nausées.

Les aliments ou préparations culinaires responsables d'intoxication alimentaire contiennent au minimum 10⁵ formes végétatives vivantes de *C. perfringens* entérotoxigènes par gramme.

- ***Staphylococcus aureus***

Les staphylocoques dorés sont responsables de 1/3 des TIAC appelées également les « Maladies du Banquet ». Bactéries aérobies anaérobies qui aiment les milieux salés. Lorsque la teneur en staphylocoques devient > 50000/g, les bactéries sécrètent une entéro-toxine (toxinogénèse inhibée à pH < 4.5 et T < 10° C) ^[7].

La maladie humaine d'origine alimentaire est une intoxication entraînée uniquement par l'ingestion de SE (enterotoxine staphylococcique) performée dans l'aliment, dans lequel *S. aureus* ou autre staphylocoque producteur de SE (enterotoxine staphylococcique) a pu se développer de façon à produire sa toxine.

Les premiers symptômes, nausées suivies de vomissements apparaissent dans les 30 minutes à 8 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. D'autres symptômes sont fréquemment décrits : douleurs abdominales, diarrhées, vertiges et frissons. La mortalité reste exceptionnelle, atteignant les individus les plus sensibles à la déshydratation. Le portage asymptomatique existe : portage intestinal, nasal et sur les mains. La dose à ingérer pour provoquer les premiers symptômes reste mal définie ^[8].

Cependant, plusieurs études ont tenté d'évaluer la dose minimale à ingérer : 20 à 144 mg ^[9].

Matériel et méthodes

Les prélèvements des échantillons du fromages, sont analysés, le plutôt possible, après leur réception au laboratoire. L'analyse microbiologique des denrées alimentaires nécessite quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'agitation, l'isolement et le dénombrement, puis, l'identification biochimique.

Echantillonnage

La réception des échantillons est d'une façon hebdomadaire depuis une usine de fabrication de différents types de fromage.

Mode opératoire

a-Pesée

Dans des conditions aseptiques 25g de chaque échantillon est pesée puis mise dans des sachets stériles.

b-Dilution

100ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) est ajoutée à l'unité d'analyse préalablement pesée.

c-Broyage

Le tout est mélangé dans un homogénéisateur, pendant 30s, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène, puis une dilution au 1/50 est réalisée.



Figure 1:Homogénéisateur

d-Technique d'isolement et de dénombrement des staphylocoques

○ *Ensemencement et incubation*

- ~ Ensemencer 0,1 ml de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, sur la surface du milieu gélosé sélectif Baird Parker.
- ~ Mettre les boîtes ainsi préparées à incubation, à $+37,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures à 48 Heures.

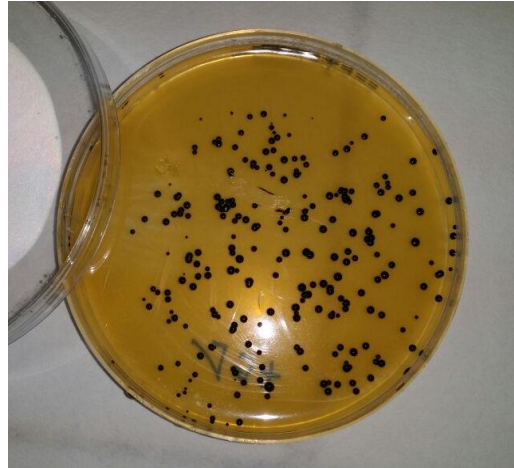


Figure 2: colonies noires avec halo clair sur le milieu gélosé sélectif Baird Parker

○ **Dénombrement**

- ~ Faire un dénombrement des colonies noires, brillantes et celles entourées d'un halo clair, présumptives de *Staphylococcus aureus* sur le milieu gélosé sélectif Baird Parker seront soumises à des tests confirmatifs à savoir le test de coagulase et le test d'agglutination au Latex.
- ~ Exprimer les résultats en UFC/ml.



Figure 3: appareil utilisé pour le dénombrement

○ **Test confirmatif**

✓ **Coagulase**

S. aureus possède plusieurs caractéristiques utilisées pour la confirmation de son identification, incluant la coagulase libre, le facteur d'agglutination (coagulase liée), la thermonucléase et la protéine A. Le test de la coagulase en tube détecte la coagulase libre et est considéré comme un test de référence pour *S. aureus* ^[10].

Ce test dure toutefois 4 à 24 heures et le plasma peut montrer une variation interlots ^[11].

En utilisant un fil stérile et dans des conditions aseptiques, on prélève une partie de chaque colonie à tester et on l'ensemence dans un tube de bouillon cœur-cervelle (BHI). On met à incubation à $(36 \pm 2) ^\circ \text{C}$ pendant (21 ± 3) h.

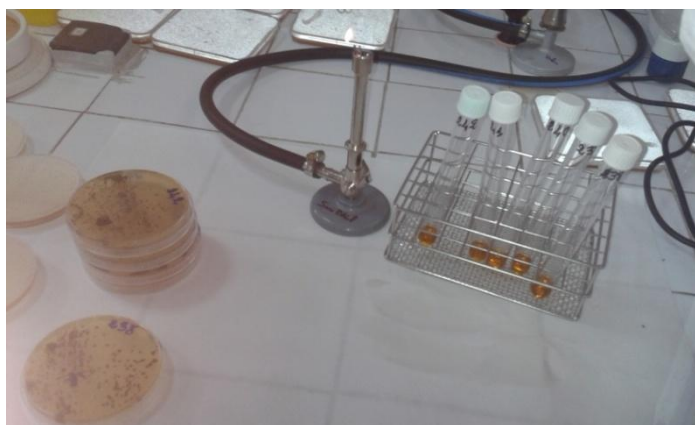


Figure 4: Ensemencement des colonies prélevées dans des tubes de BHI

On ajoute aseptiquement 0,1 ml de chaque culture à 0,3 ml de plasma de lapin et on incube à $(36 \pm 2) ^\circ \text{C}$ pendant 4h à 24h. Après 4h une première vérification est effectuée :

- ~ Si on a formation d'un coagulum dans les tubes on constate que la réaction est positive, on a présence de *Staphylococcus aureus*.
- ~ si c'est négatif on laisse les lots 24h.

✓ Test Latex

Bien agiter et vérifier l'absence d'agrégats dans les réactifs au latex avant utilisation. Pour chaque échantillon, placer une goutte de latex test sur un cercle d'une carte de 1 goutte réaction (RT64/R30369001) et 1 goutte de latex contrôle sur un autre cercle. S'assurer que les comptes gouttes sont tenus verticalement pour une distribution précise de gouttes.

A l'aide d'un bâtonnet d'homogénéisation, prélever une quantité suffisante de colonies d'une culture pure ou de colonies bien isolées, pour couvrir l'extrémité plate du bâtonnet. Il convient, à titre indicatif, de prélever une quantité de culture équivalente à environ 6 colonies de taille moyenne.

Emulsionner l'échantillon de culture dans la goutte de latex test en le frottant avec l'extrémité plate du bâtonnet. Frotter avec soin sans pour autant exercer une trop forte pression afin de ne pas endommager la surface de la carte. Certaines souches, en particulier celles d'espèces autres que *S. aureus* sont difficiles à émulsionner ; ceci doit être pris en compte lors de la lecture car le latex peut apparaître rugueux ou filandreux en présence de grumeaux de culture non émulsionnée. Etaler le latex sur environ la moitié de la surface du cercle. Eliminer le bâtonnet d'homogénéisation selon les règles de sécurité applicables.

A l'aide d'un autre bâtonnet, émulsionner un échantillon similaire à l'échantillon de culture dans le latex contrôle. Eliminer le bâtonnet d'homogénéisation selon les règles de sécurité applicables.

Faire doucement osciller la carte pendant 30 secondes en observant l'apparition d'une agglutination. La carte doit être maintenue à une distance de lecture normale des yeux (25 à 35 cm). Ne pas utiliser de loupe.

Jeter la carte de réaction utilisée selon les règles de sécurité applicables.

Résultat positif

Une agglutination du latex test accompagnée d'une absence d'agglutination du latex contrôle indique la présence de coagulase, de protéine A ou d'antigènes communs de *S. aureus* dans la culture testée. La plupart des réactions positives sont quasiinstantanées.

Résultat négatif

Une absence d'agglutination dans les deux réactifs signifie que la culture analysée n'est vraisemblablement pas de l'espèce *S. aureus*.



Figure 5: Test latex

✓ Galerie Api classique

✓ Galerie Api rapide

- Inscrire la référence de la souche sur la boîte.
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Médium ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une anse stérile, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélose (Columbia). Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu.
- A l'aide d'une pipette, prendre 2ml de l'inoculum et le mettre dans la galerie Api, essayé de répartir toute la quantité sur les cases puis incliner légèrement la boîte vers l'avant.
- Mettre à incubation pendant 4h à 37°C.
- Ajouter 2 gouttes des réactifs dans chaque puit (Pyr, Arg, Ala, Leu, Lgly, NitA, NitB)
- Lire les résultats à l'aide d'un guide de couleur.
- Obtenir un code selon les résultats est ce qu'ils sont positifs ou négatifs.
- Entrer le code dans un logiciel (ERIC) pour obtenir le type de souche trouvée.



Figure 6: Test Api rapide

Résultats

Tableau 1: Recherche et dénombrement des staphylocoques dans différents types de fromage

Référence	Nature du fromage	Absence/Présence de colonies	Test latex	Test coagulase	Dénombrement UFC/ml	Identification
1	Fromage à pate molle	absence				
2	Fromage à pate molle	absence				
3	Fromage à pate molle	absence				
4	Fromage à pate molle	absence				
5	Fromage à pate molle	absence				

6	Fromage à pate molle	absence				
7	Fromage à pate molle	présence	Négatif	négatif	$5,7 \cdot 10^4$	<i>S.warneri</i>
8	Fromage à pate molle	présence	Négatif	négatif	$1,3 \cdot 10^3$	<i>S.auricularis</i>
9	Fromage à pate molle	présence	Négatif	négatif	$1,4535 \cdot 10^5$	<i>S.saprophyticus</i>
10	Fromage à pate molle	présence	Négatif	négatif	$9,12 \cdot 10^4$	<i>S.auricularis</i>
11	Fromage à pate dure	présence	Négatif	négatif	$9,975 \cdot 10^4$	<i>S.xylosus</i>
12	Fromage à pate dure	absence				
13	Fromage à pate dure	absence				
14	Fromage à pate dure	absence				
15	Fromage à pate dure	absence				
16	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$3,135 \cdot 10^5$	<i>S.warneri</i>
17	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$4 \cdot 10^3$	<i>S.xylosus</i>
18	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$5,2 \cdot 10^2$	<i>S.warneri</i>
19	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$2,205 \cdot 10^4$	<i>S.saprophyticus</i>
20	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$2,05 \cdot 10^3$	<i>S.saprophyticus</i>
21	Fromage à pate molle	absence				
22	Fromage à pate molle	absence				
23	Fromage à pate dure	absence				
24	Fromage à pate dure	absence				
25	Fromage à pate molle	présence	négatif	négatif	$2,194 \cdot 10^5$	<i>S.saprophyticus</i>
26	Fromage à pate molle	présence	négatif	Négatif	$1,624 \cdot 10^5$	<i>S.warneri</i>
27	Fromage à pate molle	présence	négatif	Négatif	$1,197 \cdot 10^5$	<i>S.warneri</i>
28	Fromage à pate molle	absence				
29	Fromage à pate pressée cuité	absence				
30	Fromage à pate pressée cuité	absence				

Le tableau ci-dessus présente les résultats obtenus lors des analyses effectuées aux échantillons de fromages de différents types (fromages à pâtes molles et fromages à pâtes dures) reçus d'une façon hebdomadaire depuis une usine de fabrication. Ces fromages ont subi différents tests pour pouvoir identifier le type de staphylocoques présent.

Ainsi, on constate que parmi 30 échantillons de fromages analysés, la présence de staphylocoques a été retrouvée dans 13 échantillons (soit 43, 33 %) seulement.

Les types les plus fréquents de staphylocoques trouvés sont :

- *S.warneri* représentant le plus grand pourcentage égale à 16,66%:
Ce sont des bactéries Gram+ avec des cellules sphériques apparaissant en grappes. Elles provoquent rarement des maladies, mais peuvent parfois causer une infection chez les patients dont le système immunitaire est affaibli
- *S.auricularis* à une valeur de 6,66% :
Ce sont des Gram + comprenant des paires ou des tétrades de cocci. Elles peuvent être capables de provoquer des infections opportunistes ou de la septicémie.
- *S.saprophyticus* à un pourcentage de 13,32%:
Ce sont des Gram+ en forme de cocci, possédant une catalase ; pouvant être responsables d'infection urinaire chez la femme jeune.
- *S.xylosus* à une valeur de 6,66%:
Ce sont des Gram+ à coagulase négatif ; résistants aux antibiotiques.

NB : la norme utilisée est l'**iso 6888-1** : c'est une norme horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*staphylococcus aureus* et autres espèces) dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies obtenues sur milieu solide (milieu de Baird-Parker) après incubation en aérobiose à 35°C ou 37°C.

Norme créée en 1999, son code marocain est : NM 08.0.150(2008).

Conclusion :

Dans la présente étude, 30 échantillons de fromages ont été analysés de point de vue microbiologique dans le but d'évaluer leur contamination par staphylocoques. Ainsi, 13 échantillons ont montré une contamination par différentes espèces de staphylocoques : *S.warneri* , *S.auricularis*, *S.saprophyticus* et *S.xylosus*. Le nombre des staphylocoques varie de $5,2 \cdot 10^2$ à $3,135 \cdot 10^5$ UFC/ml.

Cette étude montre les degrés de contamination des fromages par staphylocoques et impose l'application de règles d'hygiène strictes aux niveaux des unités de production de cet aliment.

Recommandations :

Les staphylocoques à coagulase positive présentent un risque en industrie laitière dû à la production d'entérotoxines. Ces toxines, en l'état dans les aliments, sont à l'origine d'intoxications alimentaires provoquant notamment des vomissements incoercibles et des douleurs abdominales. Cela peut survenir lors de banquets, et conduire à une toxi-infection alimentaire collective. Les fromages au lait cru, et plus spécialement ceux ayant une acidification faible (coagulation à présure dominante), sont des produits présentant un risque accru, car les conditions de leur fabrication sont favorables au développement bactérien.

Pour limiter ce risque en production, on doit imposer la mise en place de mesures, basées sur les bonnes pratiques d'hygiène, l'appréciation des dangers, et la réalisation de contrôles pour vérifier la conformité des lots produits. Une traçabilité est indispensable afin de pouvoir prévenir le consommateur et retirer les lots du marché en cas d'anomalie.

La prévention du risque passe donc par la gestion des mammites et la mise en application des bonnes pratiques de traite. Le développement bactérien doit être limité grâce à un refroidissement efficace du lait lors de sa conservation, et en évitant des conditions trop favorables en transformation (augmentation de l'acidification, diminution de température de caillage).

Les bonnes pratiques d'hygiène doivent être respectées à partir de la production primaire, jusqu'à la vente. Le respect des règles d'hygiène et la mise en place de méthodes HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) est indispensable pour lutter efficacement contre les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire.

Les trois règles, pour la lutte contre les intoxications alimentaires, sont d'éviter au maximum les apports de microorganismes, de limiter leur multiplication et d'assainir en détruisant les microorganismes (dont les spores) et les toxines.

Bibliographie :

- (1) : Arrêté du 22 janvier 1993 relatif aux conditions hygiéniques et sanitaires de production.
- (2) : Jean-Yves LEVEAU, Marielle BOUIX, Jean-paul LARPENT 2001 (Sécurité microbiologique des procédés alimentaires).
- (3) : Récupérée de http://fr.wikibooks.org/wiki/Analyse_microbiologique_des_aliments
- Catégories : médecine| Biologie|analyse microbiologique des aliments (Livre).
- (4) : Siegman et al, 2002 ; les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire.
- (5) : Aureli et al. 2000, Ooi et al. 2005. les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire.
- (6) : Ricard et al. 2008.les toxi-infections alimentaires collectives et microorganismes.
- (7): Poumeyrol et Popoff, 2006, toxi-infections alimentaires collectives ;1999-2000 :implications,epidémiologie.
- (8): Peacock et al, 2001.analyse microbiologique des aliments 2009-2010 .
- (9): SCVPH, 2003.recherches du genre staphylococcus.
- (10): Kloos, W.E. and Lambe, D.W. (1991).Staphylococcus. Manual of Clinical Microbiology,5th Ed., edited by Balows, A., Hausler, W.J., Herrmann, K.L., Isenberg, H.D. and Shadomy, H.J. American Society for Microbiology, Washington, D.C.Pages 222/237.
- (11): Piper, J., Hadfield, T., et al (1988). Efficacies of rapid agglutination tests for identification of MethicillinResistant Staphylococcal strains as Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol, 26, 1907- 1909.

Annexes :

Eau peptonée tamponnée (EPT)

Composition (g/l) :

- ~ Peptone de caséine 10g.
- ~ Chlorure de sodium 5g.
- ~ Phosphate de sodium 3.5g.
- Phosphate de potassium 1.5g. / pH final à 25°C : 7,0 ±0,2

Baird Parker:

Composition (g/l):

- ~ Extrait de viande 5g.
- ~ Peptone de caséine 10g.
- ~ Extrait de levures 1g.
- ~ Agar agar 15g.
- ~ Eau 950ml
- ~ Agents inhibiteurs :
- ~ Pyruvate de sodium 10g.
- ~ Glycine 12g.
- ~ Chlorure de lithium 5g.
- Emulsion de jaune d'œuf – tellurite 50ml. / pH : 6.8

Bouillon cœur -cervelle (BHI) :

Composition (g/l):

- ~ Extrait cœur cervelle 17.5g.
- ~ Peptone pancréatique de gélatine 10g.
- ~ Chlorure de sodium 5g.
- ~ Phosphate de disodique 2.5g.
- Glucose 2g. / pH : 7.4

Columbia

Composition (g/l):

- ~ Polypeptones : 17,0 g.
- ~ Peptone pancréatique de cœur : 3,0 g.
- ~ Amidon de maïs : 1,0 g.
- ~ Chlorure de sodium : 5,0 g.
- ~ Extrait de levure : 3,0 g.

Agar : 13,5 g. / pH = 7,3 ± 0,2

Galerie Api classique

Préparation de la galerie :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée ou déminéralisée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage individuel, et la placer dans la boîte d'incubation.
- Préparation de l'inoculum
- Ouvrir une ampoule d'API Staph Médium ou utiliser un tube contenant 5 ml d'eau physiologique stérile ou d'eau distillée stérile, sans additif.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, prélever une seule colonie bien isolée sur milieu gélose. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18-24 heures).
- Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être inoculée extemporanément.

Inoculation de la galerie :

- A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, remplir les tubes de la galerie avec API Staph Médiumensemencé. Pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la pipette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant.
- Créer une anaérobiose dans les tests ADH et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine pour former un ménisque convexe.
- Renfermer la boîte d'incubation.
- Incuber à $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 18-24 heures.

Lecture de la galerie :

- Après incubation, lire les réactions conformément au tableau de lecture en ajoutant 1 goutte de chacun des réactifs suivants
- Test VP ; VP 1 et VP 2.
- Test N1T : N1T 1 et N1T 2.
- Test PAL : ZYM A et ZYM B.

Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres qui constituent le profil numérique.

Identification :

Elle est réalisée à l'aide du Catalogue Analytique ou du logiciel d'identification.