



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Projet de Fin d'Etudes

Licence Sciences & Techniques
Sciences Biologiques Appliquées et Santé
(LST - SBAS)

Étude d'*Escherichia coli* isolée à partir des saucisses crues

Présenté par : CHAMI Amina

Encadré par: Pr HALOTI Said

FST-Fès

Dr BOUHRIF Brahim

IPM-Casablanca

Soutenu le : 09 juin 2017

Devant le jury composé de :

- | | | |
|----------------------|----------------|--------------|
| ❖ Pr HALOTI Said | FST-Fès | Encadrant |
| ❖ Pr SEFRIQUI Samira | FST-Fès | Examinatrice |
| ❖ Dr BOUHRIF Brahim | IPM-Casablanca | Encadrant |

Stage effectué à l'Institut Pasteur du Maroc.

Année universitaire 2016-2017

Sommaire

Partie I : Etude bibliographique

1. Toxi-infection alimentaire (TIA).....	3
a. Définition.....	3
b. Les différentes bactéries responsables de TIA.....	3
2. Mode de transmission.....	4
a. Transmission alimentaire.....	4
b. Transmission interhumaine.....	5
c. Transmission milieu extérieur.....	5
3. Généralité sur <i>E. coli</i>	5
a. Historique.....	5
b. Taxonomie et définition.....	5
c. Les caractères bactériologiques.....	6
d. Les différents pathovars.....	8
4. Les facteurs de virulences.....	10

Partie 2 : Matériel et méthodes

1. Echantillonnage.....	13
2. Appareils utilisés.....	13
3. Isolement des coliformes thermo tolérants.....	15
4. Confirmation d' <i>Escherichia coli</i>	16
a. Test de Mackenzie.....	16
b. Test de confirmation.....	17

Partie 3 : Résultats et discussion

1. Isolement et dénombrement des coliformes thermo-tolérants.....	20
2. Confirmation des <i>E. Coli</i>	21
Discussion	22
Conclusion	23

Références bibliographiques

Annexes

DEDICACES

*A lui revient toute gloire et honneur, c'est à ALLAH
maître de l'univers que nous ouvrons cette page.*

Je dédie ce travail

*À mes parents pour leur amour, soutien permanent et
qui ont consenti d'énormes sacrifices afin de nous mener
à la réussite de nos études.*

*A travers ce travail qu'ils croient à l'expression de
notre amour.*

*À tous mes enseignants, pour leurs vaillants efforts
qu'ils m'ont prodigué.*

*À mon frère Mahmoud pour son amour et son
encouragement.*

*À ma chère grande famille et toutes mes amies
À tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce travail.*

Que Dieu leur accorde santé et prospérité.

Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier M. BOUHRIF Brahim de m'avoir accepté en tant que stagiaire au sein du service de sécurité des aliments et de l'environnement.

Je souhaite exprimer ma gratitude à mon encadrant : Monsieur HALOTI Said, professeur à la FST de Fès, pour ses conseils et ses directives durant ce travail.

J'exprime mes grands remerciements à Madame SEFRIQUI Samira, professeur à la FST de FES de m'avoir fait l'honneur de faire partie de jury.

D'une façon générale, je remercie l'ensemble de l'Institut Pasteur de Maroc pour l'intérêt qu'ils m'ont porté tout au long de mon stage ainsi que leur aide et précisions.

Présentation de l'Institut Pasteur du Maroc

Mon stage a été effectué au sein du département de sécurité des aliments et de l'environnement qui réalise des analyses microbiologiques, chimiques et toxicologiques, pour les entreprises agroalimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques, pour la restauration collective, pour plusieurs organismes publics et privés de référence.

La mission confiée au département contrôle dans le cadre de ces conventions consiste essentiellement en l'assistance de ces structures et leur accompagnement dans leurs démarches-qualité.

-la sécurité alimentaire comporte quatre dimensions :

- Disponibilité : production intérieure, capacité d'importation, de stockage et aide alimentaire.
- Accès : dépend du pouvoir d'achat et de l'infrastructure disponible.
- Stabilité : des infrastructures mais stabilité climatique.
- Qualité et sécurité sanitaires : salubrité/hygiène, non toxicité, accès à l'eau potable.

Organigramme de l'IPM :

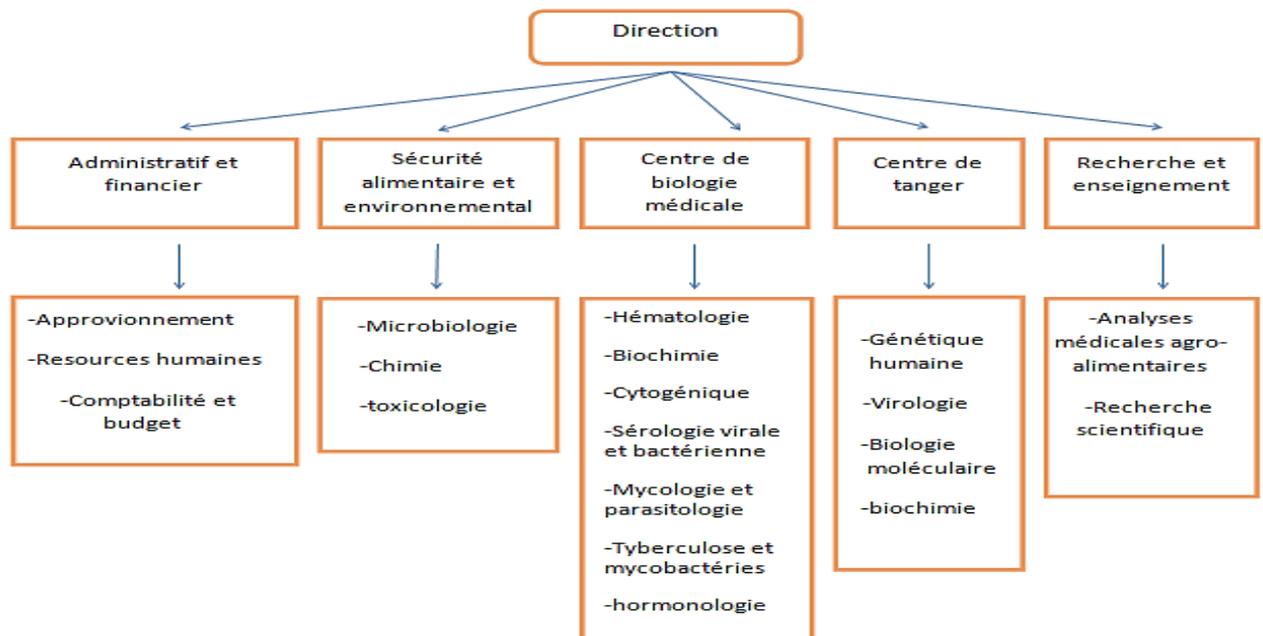


Figure1 : Organigramme de l'institut Pasteur du Maroc.

Liste des abréviations

CNR : Centre national de référence

DO : Déclaration obligatoire

EHEC: *E. Coli* entérohémorragiques.

PCA: Gélose pour dénombrement (Plate Count Agar).

STEC: *E. coli* producteurs de shiga-toxines.

TCS : Gélose Trypticase soja.

TIA: Toxi-infection alimentaire.

TIAC: Toxi-infection alimentaire collective.

VRBL: Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre.

Liste des figures

Figure 1 : Organigramme de l'institut Pasteur du Maroc

Figure 2 : Mode de transmission des STEC.

Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la shiga-liketoxine Stx2 d'une souche EHEC.

Figure 4 : Appareil à dilution automatique

Figure 5 : Broyeur microbiologique

Figure 6 : Ensemenceur automatique

Figure 7 : Compteur automatique

Figure 8 : Galerie API 20 E

Figure 9 : Description de la galerie API

Figure 10 : La poussée des bactéries dans les différents milieux

Figure 11 : Identification d'*E. Coli* par le test de Mackenzie

Figure 12 : La confirmation par la galerie API

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia*.

Tableau 2 : Milieux de culture utilisés dans le laboratoire pour la recherche de chaque groupe de germes, avec le temps et la température d'incubations adéquates.

Tableau 3 : La lecture de la galerie API 20 E.

Tableau 4 : Dénombrement des colonies dans le milieu VRBL-CTH.

Tableau 5 : Dénombrement des colonies dans le milieu PCA.

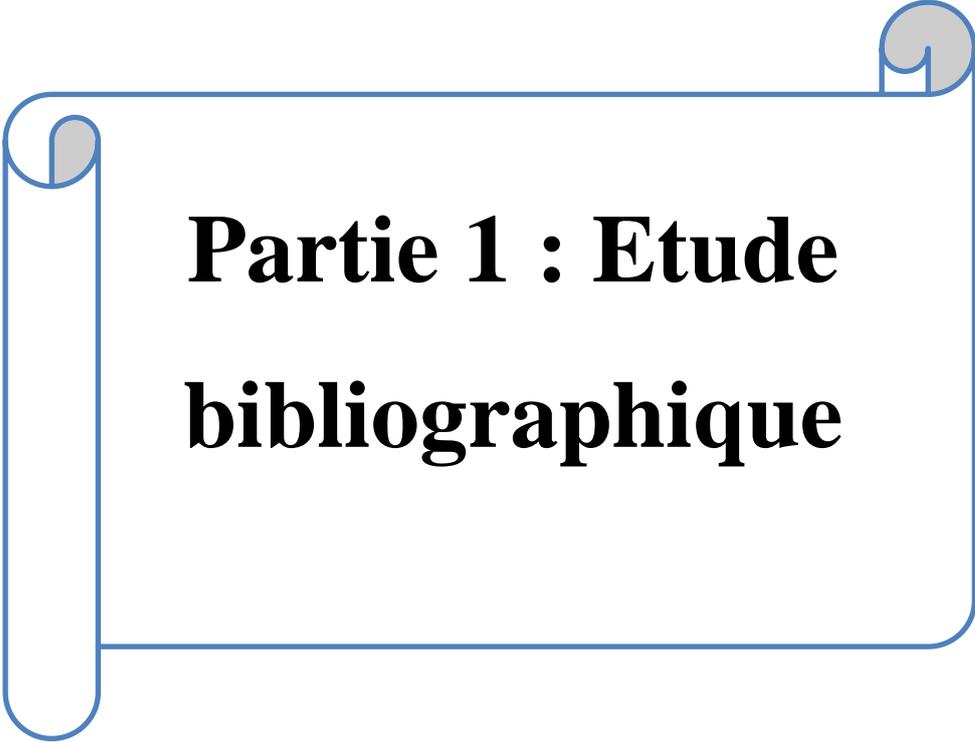
Introduction générale

Les souches d'*Escherichia coli* se trouvent dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, y compris les humains, où elles jouent généralement le rôle des bactéries commensales. Cependant, par acquisition et combinaison de facteurs de virulence, ces souches commensales normalement inoffensives peuvent devenir des agents pathogènes très adaptés capables de causer une variété de maladies, de la gastro-entérite à des infections extra-intestinales (Alpha, 2013).

Parmi les *E. Coli* pathogènes celles productrices de Shiga-toxines (STEC) qui sont responsables des toxi-infections d'origine alimentaire qui se traduisent par des diarrhées mais aussi par des syndromes plus graves pour l'homme tel que le syndrome hémolytique urémique pouvant provoquer la mort. Il s'agit d'agents zoonotiques dont le réservoir principal est le bovin et les autres ruminants.

Les STEC ont été à l'origine de nombreux cas d'infections humaines à travers le monde, essentiellement consécutives à la consommation d'aliments contaminés d'origine animale (la viande hachée de bœuf représente le risque majeur d'infections à STEC car elle est parfois consommée mal cuite).

Durant ce stage effectué au sein du laboratoire de microbiologie et hygiène des aliments à l'Institut Pasteur du Maroc. Nous avons étudié 3 échantillons de saucisses crues dans le but de la recherche d'*Escherichia coli* qui sera isolé et identifié. La présence d'*E. Coli* est révélée par le test de Mackenzie, qui sera par la suite confirmé par la galerie API 20 E.



**Partie 1 : Etude
bibliographique**

1. Toxi-infection alimentaire (TIA)

a. Définition

C'est une intoxication alimentaire provoquée par l'ingestion d'une toxine bactérienne présente dans les aliments, qui peut causer des nausées, des vomissements suite à la consommation de l'aliment (**Dundas, Paton**, 1998).

Les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) se définissent par l'apparition d'au moins 2 cas similaires d'une symptomatologie en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

En France, cette surveillance est assurée par la déclaration obligatoire (DO) depuis 1987 et est complétée par les données provenant du Centre national de référence (CNR) des *salmonelles*.

La surveillance des TIAC contribue à la mise en place et à l'évaluation de mesures visant à prévenir ces événements et contribue ainsi à la sécurité alimentaire [1].

Les germes responsables de la TIAC

b.1. *Salmonella*

Il s'agit de bactérie qui cause le TIAC à 42.8%. Son réservoir est l'intestin des animaux, la contamination de l'homme se fait de façon directe par contact ou par l'intermédiaire d'aliments souillés (**Doyle**, 1990). Elle est la première cause de toxi-infection alimentaire en France (**Lepoutre**, 1996), et est classée en 2 catégories : sérovars strictement humains qui causent de syndrome de typhoïde ou paratyphoïde, et sérovars ubiquistes causant une TIA, après incubation de 12h à 36h. Elle cause une gastro-entérite accompagnée de fièvre, diarrhée, douleur abdominale et vomissement, tout cela se manifeste chez les personnes immunodéprimées, les nourissants et même les personnes âgées (**Le Minor**, 1989).

b.2. *Campylobacter*

C'est un genre de bactéries Gram négatif, micro-aérophiles, oxydase positive, non sporulé provoquant des intoxications alimentaires. Elles sont présentes dans l'intestin de nombreux animaux d'élevage, et considérées comme étant la principale cause bactérienne de gastro-entérites humaine dans le monde, avec une incidence croissante dans les pays développés, qui pourrait notamment être dû à la concentration du bétail (**Graham**, 2011).

b.3. *E. Coli*

Escherichia coli est une bactérie qui s'établit dans le tube digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. La majorité des souches d'*E. Coli* sont inoffensives, quelques-unes seulement sont pathogènes. C'est le cas des souches d'*E. Coli* dites entéro-hémorragiques (ECEH). Ces dernières provoquent des diarrhées sanglantes et produisent une puissante toxine à l'origine du syndrome hémolytique et urémique (SHU). Régulièrement, des souches d'ECEH sont la cause d'intoxications alimentaires via la consommation de produits animaux mal cuits ou consommés crus. Les fruits et les légumes frais, ayant été en contact avec ces souches peuvent être également à risque [2].

2. Les modes de transmissions

Les infections humaines par *E. Coli* peuvent être à l'origine de la consommation des aliments contaminés, transmission interhumaine, ou l'ingestion d'eau contaminée, ou même le contact avec les animaux (notamment les bovins) (figure 2).

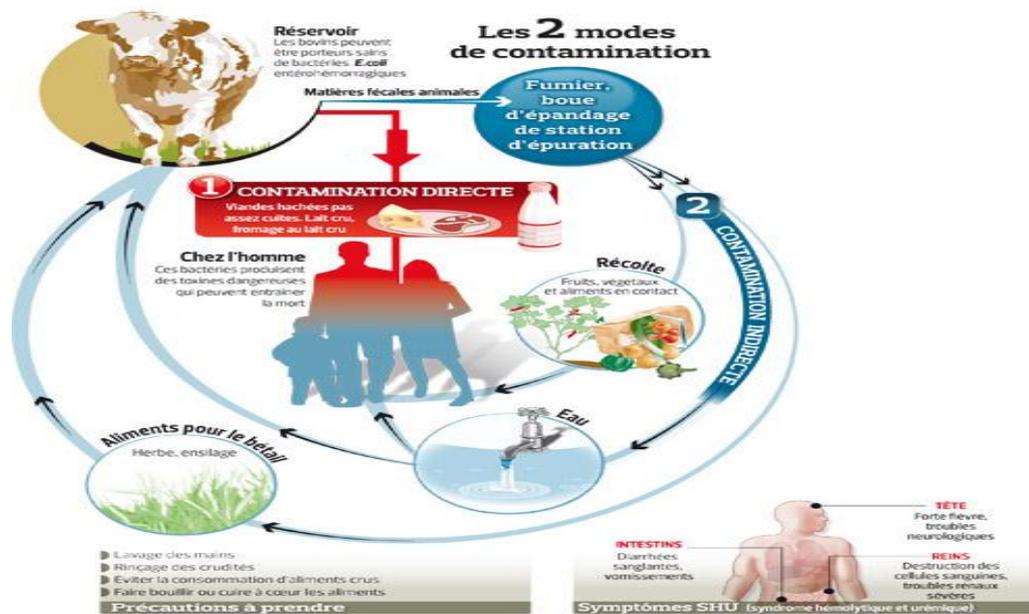


Figure 2 : Mode de transmission des STEC

a. Transmission alimentaire

La plupart des épidémies recensées à ce jour sont liées à l'ingestion de denrées animales (consommer par le bétail) ou d'origine animale contaminée par *E. Coli*. De nombreuses toxi-infections alimentaires dans le monde sont causées par la viande de bœuf qui est

insuffisamment cuite, l'ingestion de lait ou des produits laitiers non pasteurisés ou même la consommation de légumes crus (Loukiadis, 2007).

b. Transmission interhumaine

Cette transmission est active lorsque l'hygiène générale est mauvaise, suite à un contact avec des personnes malades, ou par la transmission oro fécale dans les crèches (Karmali, 1989). C'est généralement une contamination indirecte, le taux de porteurs sains est plus élevé chez les personnes qui sont en contact permanent avec les animaux (Chalmers, 1999).

c. Transmission par le milieu extérieur

La transmission des *E. Coli* par contact direct ou indirect avec les animaux de ferme où leurs déjections ont été à l'origine d'infection humaine sporadique mais également d'épidémies. D'autre part la baignade en lac ou pataugeoires a été citée à plusieurs reprises lors d'épidémies, ainsi la présence d'*E. Coli* dans les boues et les eaux de stations d'épuration (Vimont, 2007).

3. Généralité sur *E. coli*

a. Historique

Escherichia coli fut initialement isolé et décrite par le pédiatre allemand Théodore Escherich, en 1885. Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, l'a nommée *Bacterium coli* commune, ce que l'on peut traduire par «bactérie commune du colon». C'est en 1919 que CASTELLANI et CHALMERS lui donnent son nom définitif en hommage à ESCHERICH, *Escherichia* est ensuite devenu le genre-type de la famille des *Enterobacteriaceae* et *E. coli* l'espèce type de ce genre (COHEN, 2006).

b. Taxonomie et définition

Escherichia coli appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Escherichia* compte 5 espèces : *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*, elles possèdent des caractères biochimiques différents qui permettent leurs différenciations (COHEN, 2006).

L'espèce *E. coli* est considérée comme un commensal de la microflore digestive de l'homme et de la plupart des animaux à sang chaud. Les *E. coli* peuvent être isolés de l'intestin de nombreuses espèces animales. Ces derniers peuvent constituer un réservoir et la

dissémination dans l'environnement provient essentiellement de contaminations fécales. Ces bactéries peuvent aussi contaminer l'eau, les sous-produits d'activités agroalimentaires et les aliments pour animaux. Le risque de la contamination des denrées alimentaires d'origine animale est fonction de l'importance du portage animal, mais également du respect des procédures d'hygiène appliquées notamment en abattoir et dans les ateliers de transformation (COHEN, 2006).

c. Les caractères bactériologiques

c.1. Morphologie et caractères cultureux

Les *E. Coli* sont des bacilles à Gram négatif, de 0,5 um de large sur 3 um de longueur, non sporulés, généralement dépourvu de capsule, possédant une ciliature péritriche pour les espèces mobiles, isolés, groupés par deux ou plus rarement en amas. Les *E. Coli* peuvent apparaître sous forme coccobacillaire ou filamenteuse dans les vieilles cultures. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des fimbriaes ou pilis communs qui sont des facteurs d'adhésion. Ce sont des coliformes aéro-anaérobies facultatives qui possèdent à la fois un métabolisme respiratoire et fermentatif (Tap, 2004).

c.2. Caractère biochimique

Les *E. Coli* sont des bactéries oxydase négative, catalase positive et nitrate réductase positive, capables de dégrader le glucose, le lactose et le mannitol et d'autres sucres avec une forte production du gaz. Par ailleurs, les *E. Coli* possèdent une enzyme « tryptophane bactérienne » responsable de la dégradation du tryptophane pour produire de l'indole. Chaque espèce du genre *Escherichia* possède des caractères biochimiques spécifiques permettant de les différencier (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux critères différentiels des espèces du genre *Escherichia* (Vimont, 2007).

Caractéristiques	<i>E. coli</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. hermanii</i>	<i>E. vulneris</i>	<i>E. fergusonii</i>
Indole	+	+	+	-	+
Pigment jaune	-	-	+	(+)	-
LDC	(+)	(+)	-	+	+
ODC	+/-	+/-	+	-	+
B-glycosidase	-	-	-	+	-
B-glucuronidase	(+)	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-
Malonate	-	-	-	+	-
Adonitol	-	-	-	-	+

(+) : positif pour la majorité des souches ; +/- : positif ou négatif selon les souches

LDC : Lysine Décarboxylase ; ODC : Ornithine Décarboxylase.

c.3. Caractères antigénique

c.3.1. Antigène O

C'est un antigène somatique qui correspond au lipopolysaccharide de surface qui fait partie du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à gram négatif avec une composition très complexe, il existe 181 types antigéniques détectables par agglutination par les méthodes de sérotypage moléculaire [3].

c.3.2. Antigène H

Cet antigène correspond aux protéines flagellaires. La diversité des antigènes est due aux différents types de flagelline (composante essentielle du flagelle). Il existe 56 sérotypes difficiles à mettre en évidence en raison de leur fragilité et de la faible mobilité de la plupart des souches lors de leur isolement [3].

c.3.3. Antigène K

Il existe 93 des antigènes K, qui sont des antigènes de surface de nature polysaccharidique qui constituent soit:

- une enveloppe qui est très variable.
- soit l'antigène K est capsulé, dans ce cas les colonies bactériennes sont alors mucoïdes et l'antigène O est masqué [3].

d. Les différents pathovars d'*E. Coli*

d.1. Les *E. Coli* à l'origine de pathologies extra intestinales

d.1.1. Les *E. Coli* uropathogénique (UPEC)

Cette infection se fait à 2 niveaux, elle est la plus fréquente, isolée dans les infections ascendantes du système urinaire tel que :

-Une exfoliation épithéliale qui favorise la formation des IBC (intracellulaire bacterial communities) et une apoptose cellulaire au niveau du système urinaire bas.

-Une pyélonéphrite due à la production de la toxine comme l'hémolysée SAT, des composants bactériens comme les LPS et adhésine du type 1 et P. La bactérie est capable de traverser la paroi des tubules quand l'épithéliale soit endommagée, elle pénètre dans la circulation et provoque une bactériémie (**Gabriel**, 2010).

d.1.2. Les *E. Coli* associés à des méninges néonatales (MNEC)

C'est la cause principale de la méningite chez les nouveau-nés, elle peut provoquer même la mort atteignant un pourcentage de 40%, elle porte un antigène capsulé proche de celui de *Neisseria meningitidis*. Ils produisent des protéines transmembranaires qui leur permettent de s'attacher à la paroi liminale de l'endothélium à l'aide des récepteurs d'une glycoprotéine au niveau du cerveau des nouveau-nés (**X. Durrmeyera**, 2012).

d.2. Les *E. Coli* à l'origine de pathologie intestinales

d.2.1. *E. Coli* entérotoxinogènes (ETEC)

Associés à 2 syndromes cliniques importants, les diarrhées de nourrissons dans les pays en voie de développement ainsi que la diarrhée du voyageur. Ce sont des souches possédant au moins une toxine qui appartient soit aux entérotoxines thermostables (ST) ou les

entérotoxines thermolabiles (LT), possèdent ainsi les facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser la muqueuse intestinale (**Levine**, 1987).

d.2.2. *E. Coli* entéroinvasifs (EIEC)

Sa pathogénicité est traduite par une invasion de l'épithélium intestinal, elles sont responsables d'une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées accompagnées d'une diarrhée aqueuse (selles contenant du sang et du mucus) (**MONTET**, 2009).

d.2.3. *E. Coli* entéropathogènes (EPEC)

Responsable de diarrhées infantiles, touche surtout les enfants qui ont un âge de moins de 3 ans. Ce sont des lésions histopathologies appelées aussi lésions d'attachement et d'effacement qui apparaissent lors d'une infection. Cette pathologie est caractérisée par l'effacement des microvillosités intestinales et une adhérence entre les bactéries et la membrane cytoplasmique des entérocytes (**Andrade**, 1989).

d.2.4. *E. Coli* entéroaggrégatifs (EAEC)

Ils sont responsables de retard de croissance et de diarrhée persistante dans les pays en voie de développement ainsi que les pays industrialisés. Elles causent une nécrose au pôle apical des villosités avec un œdème inflammatoire et hémorragique de la sous-muqueuse (**Kaper**, 2004).

d.2.5. *E. Coli* enterohémorragiques (EHEC)

Ils sont à l'origine de troubles plus au moins sévères allant d'une simple diarrhée hémorragique à des colites hémorragiques, cela peut mener même à la mort (**Konowalchuk**, 1977). Les EHEC possèdent au moins un gène de Stx (Shiga-toxine) (**O'Brien**, 1980).

4. Facteur de virulence

a. Shiga-toxine (stxs)

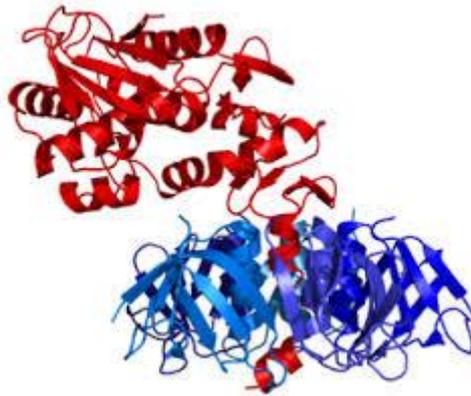


Figure 3 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de la shiga-liketoxine Stx2 d'une souche EHEC.

Il s'agit de la shiga-toxine stx1 ou stx2, ce sont les principaux facteurs de virulence des STEC. Son nom provient de *Shigella dysenteriae*, car elle produit une toxine similaire à celle de la shigatoxine, appelé également verotoxine.

L'activité N-glycosylase de la Shiga-toxine bloque la sous-unité 60S du ribosome, ce qui cause l'arrêt du système protéique et donc la mort des cellules après avoir été internalisée par endocytose.

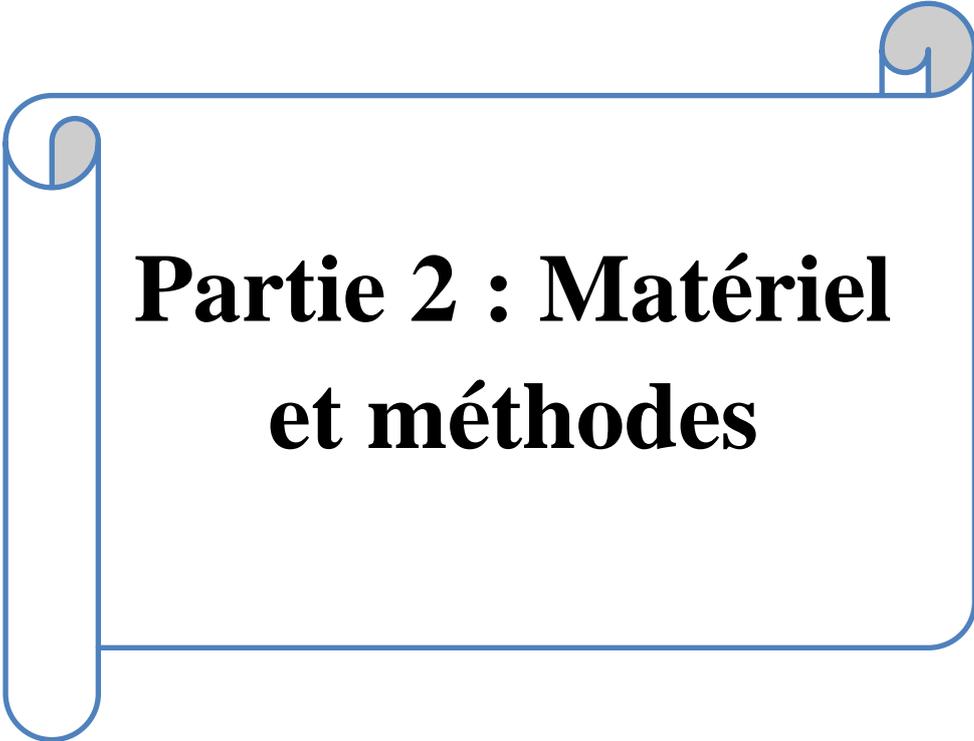
Une fois fixée sur le récepteur membranaire, les Shiga-toxines peuvent induire la production de cytokines par les cellules épithéliales intestinales, ces derniers produisent Gb3 à la surface des cellules et les rendent plus sensibles à l'action de la Shiga-toxine. En activant la réponse inflammatoire, l'induction d'IL-8 par les cellules épithéliales permet le développement des lésions au niveau de la barrière intestinale et donc la mort de la cellule (**Gourmelon**, 2006).

b. Les facteurs d'adhésion

Ce sont les éléments majeurs de la pathogénicité, les mécanismes d'adhésion font appel à des fimbriaes, des protéines de membrane externe et des lipopolysaccharides (**Paton**, 1998).

c. Entérohémolysine (E-Hly A)

L'activité cytolytique de la toxine E-hlyA est liée à sa capacité d'insertion dans la membrane cytoplasmique et sa capacité à former des pores, engendre une lyse osmotique des cellules. Elle permettrait le développement des cellules bactériennes grâce au fer libéré après la lyse des hématies (**COHEN**, 2006).



Partie 2 : Matériel et méthodes

➤ Matériels

1. Échantillonnage

Durant la période de mon stage effectué au laboratoire de microbiologie et hygiène des aliments à l'Institut Pasteur du Maroc. Nous avons étudié 3 échantillons des saucisses crues dans le but de la recherche d'*Escherichia coli*, dans le cadre de la recherche des certaines causes des toxi-infections alimentaires. Ces souches ont été acheminées au laboratoire pour l'isolement, l'identification et caractérisation.

2. Appareils utilisés :

a. Appareil à dilution automatique

Le Dilumat 4 (AES LABORATOIRE) est un dispositif qui permet la réalisation de la dilution mère des échantillons à analyser. Le Dilumat pèse la quantité d'échantillon posée dans le sachet et lui ajoute exactement le volume de diluant correspondant au facteur de dilution souhaité (**figure 4**).



Figure 4 : Appareil à dilution automatique

b. Broyeur microbiologique

Les homogénéiseurs microbiologiques Stomasher AES LABORATOIRE assurent un mélange et une homogénéisation rapides des échantillons en laboratoire. Ils disposent de deux palettes oscillantes, qui exercent en alternance une pression sur le sachet en plastique stérile où se trouve l'échantillon, et un écran où sera mentionnée la durée de broyage (**figure 5**).



Figure 5 : Broyeur microbiologique

c. Ensemenceur automatique

L'ensemenceur spiral AES LABORATOIRE est un dispositif qui répartit un volume prédéterminé du liquide sur la surface d'une boîte de pétri gélosée disposée sur une table en rotation.

L'arbre distributeur se déplace du centre vers la périphérie de la boîte et distribue le volume sous la forme d'une spirale d'Archimède. Le volume réparti décroît au fur et à mesure du déplacement du stylet du centre vers la périphérie de la boîte, de sorte qu'une relation inverse existe entre le volume déposé et le rayon de spirale. Le volume d'échantillon réparti dans chaque secteur est connu et constant. Une pompe à vide est requise pour permettre le changement et la répartition de liquide (**figure 6**).



Figure 6 : Ensemenceur automatique

d. Un compteur automatique

C'est un système muni d'une caméra numérique couleur et branchée à un ordinateur, il permet la visualisation en temps réel des boîtes à l'écran avec contrôle des colonies comptées. Il réalise un comptage précis et rapide (**figure 7**).



Figure 7 : Un compteur automatique

Le laboratoire dispose également de : Bain-marie (GFL), Distributeur d'antibiotique, Vortex mixeur, Micro-onde et 3 étuves : JOUAN (30°C, 37°C et 44°C).

Dans le but de la recherche des coliformes thermotolérants, on a utilisé d'une part le milieu VRBL (gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) qui est incubé pendant 24h à 44°C et d'autre part le milieu PCA qui est spécifique pour les germes aérobies mésophiles qui est incubé pendant 48h à 30°C.

➤ **Méthodes**

3. Isolement des coliformes thermo-tolérants :

Dans l'analyse microbiologique, les saucisses ramenées au laboratoire ont subi la préparation suivante :

- On pèse 25g de l'échantillon sur le dilumat dans un sachet stomacker stérile qu'on dilue au 1/10^{ème} par l'eau péptonée tamponnée.
- On procède à un broyage du mélange pendant 15 à 30 secondes.
- Ensemencement de 50 ul de l'échantillon par la méthode en spiral logarithmique à l'aide d'un automate sur une gélose de VRBL. Ce milieu contient du désoxychlorate qui inhibe les Gram+ (mais pas les coliformes), du lactose

utilisé comme source de carbone et d'énergie et du rouge neutre qui représente un indicateur de pH permettant la lecture du caractère biochimique (lactose).

- Puisque notre but est d'isoler la bactérie *E. Coli* qui de nature thermotolérante, on incube les boîtes de pétri du VRBL-CTH pendant 24h à température de 44°C, ensuite les colonies rouge/rose sont ensemencées dans l'eau peptonée exempte d'indole qui sera à son tour incubé pendant 24h à température de 37°C que l'on utilisera pour l'identification de la bactérie d'*E. Coli*.

Tableau 2 : Milieux de culture utilisés dans le laboratoire pour la recherche de chaque groupe de germes, avec le temps et la température d'incubation adéquate.

Milieux de culture	Types de germes	Temps et Température d'incubation
VRBL*	- coliformes totaux	- à 30°C pendant 24h
	- coliformes thermo-tolérants	- à 44°C pendant 24h
PCA*	Germes aérobies mésophiles	à 30°C pendant 48h
VRBG	Entérobactéries	à 37°C pendant 24h
BP	Staphylocoques	à 37°C pendant 48h

Puisque *E. Coli* étant un coliforme thermotolérant, on peut constater que le milieu spécifique de ce dernier est VRBL, alors notre suivie se déroulera comme suite.

4. Confirmation d'*E. Coli*

L'identification d'*E. Coli* est réalisée par le test de Mackenzie, une fois positif il sera confirmé par la détermination du profil biochimique de la galerie API 20 E.

a. TEST DE MACKENZIE

Dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole (EPEI) est inoculée une colonie, après son incubation, il y a production d'indole détecté par un anneau rose en surface du milieu qui est apparent après l'ajout du réactif de Kovacs, c'est cet anneau qui permet de révéler la présence d'*E. Coli* ou une autre bactérie telle que « *Klebsiella oxytoca* » et certaines espèces de *Citrobacter*. Il faut donc identifier *E. Coli* par la recherche de son biotype (galerie API 20 E).

b. TEST DE CONFIRMATION PAR L'UTILISATION DE LA GALERIE API 20 E

C'est une galerie de 20 tubes contenant des substances sous forme déshydratée et prête à l'emploi permettant de réaliser des tests biochimiques et d'identifier des bacilles Gram- appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (**figure 8**).

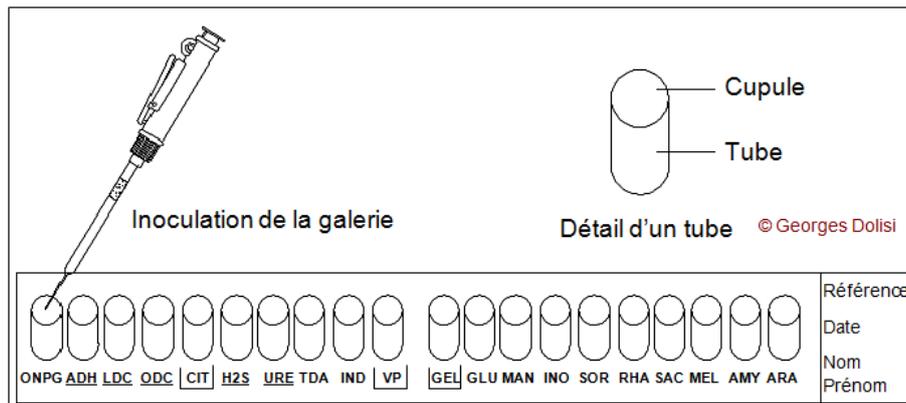


Figure 8 : Galerie API 20 E.

Protocole

- ❖ Préparation de l'inoculum : introduire une souche pure ou une colonie bien isolée à partir de TCS dans 5 ml d'eau distillée stérile.
- ❖ Ensemencement de la galerie : introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile ouverte, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation des bulles. Pour certains caractères (CIT, VP et GEL), il faut remplir tube et cupule. Pour d'autres caractères (ADH, LDC, ODC, H2Set URE), il faut remplir le tube et recouvrir d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose.
- ❖ Lecture de la galerie API20E : la lecture se fait après 24h d'incubation à 37°C, on ajoute les réactifs adéquats aux cupules TDA, IND, VP et GLU.

TDA		Chlorure de fer III
IND		réactif de James ou Kovacs
VP		NaOH + a naphtol
GLU		Acide Sulfanillique +Naphtyl 1 amine

Tableau 3 : La lecture de la galerie API 20 E.

Microtube	Substrat :	Caractère recherché	Révéléateur	Lecture directe ou indirecte Test (si nécessaire)	Résultat -	Résultat +
ONPG	ONPG = Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	Béta galactosidase		Lecture directe		
ADH LDC ODC	Arginine Lysine Ornithine	Arginine Dihydrolase Lysine Décarboxylase Ornithine Décarboxylase	Rouge de phénol	Lecture directe		
[CIT]	Citrate	Utilisation du citrate	BBT	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Fe III	Lecture directe		
URÉ	Urée	Uréase	Rouge de Phénol	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase		Lecture indirecte		
IND	Tryptophane	Tryptophanase ou production d'indole		Lecture indirecte		
[VP]	Pyruvate de sodium	production d'acétoine (3-hydroxybutanone)		Lecture indirecte		
[GEL]	Gélatine	gélatinase	Particules de charbon	Lecture directe		
GLU à ARA = zymogramme	Substrat carboné (glucide)	Utilisation de substrats carbonés (glucides)	BBT	Lecture directe		
NO ₂ /N ₂	Nitrates (NO ₃ ⁻)	Nitrate réductase		Lecture indirecte		

Cette galerie se différencie en sept classes, chaque classe contient trois cupules et chaque cupule de ces trois est noté 1 pour le premier, 2 pour le deuxième et 4 pour le troisième. Si la coloration est positive, on donne le signe plus à la cupule, et en fin de compte on additionne l'ensemble des nombres portés sur la cupule de couleur positive et on se réfère au catalogue API20E pour identifier la souche d'après le code (**figure 9**).

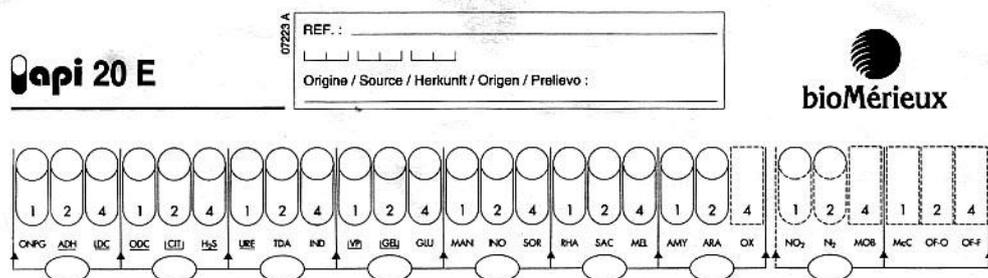
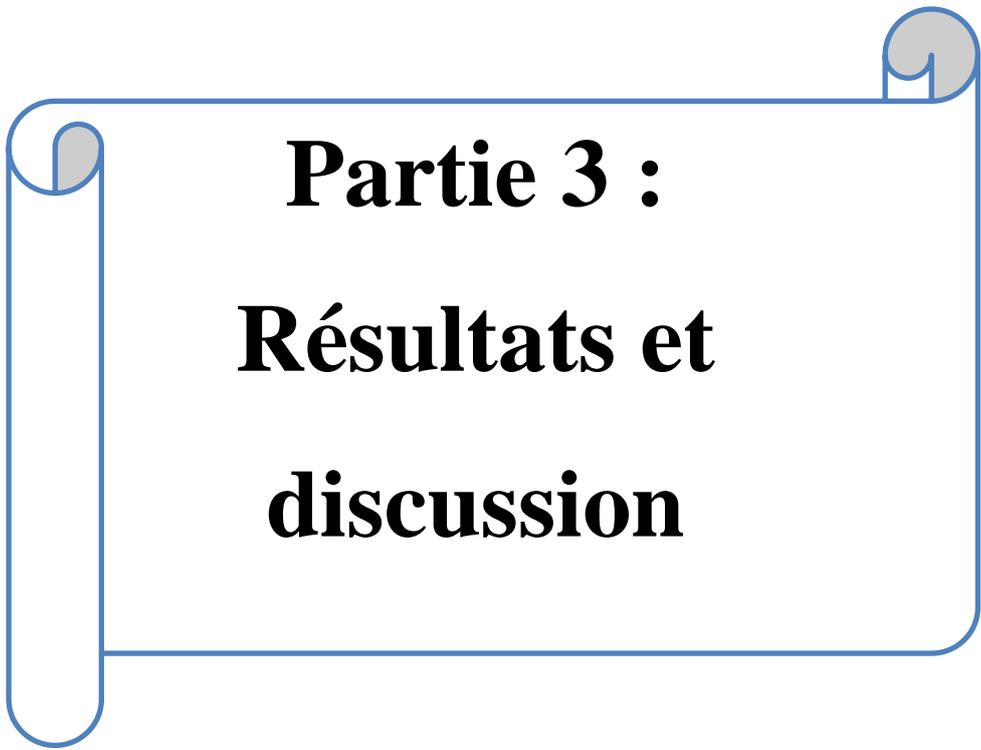


Figure 9 : Description de la galerie API 20 E



Partie 3 :
Résultats et
discussion

1. Isolement et dénombrement des coliformes thermo-tolérants

Après la pesée, le broyage, l'ensemencement et l'incubation à 30°C pour PCA et 44°C pour VRBL-CTH, on a abouti à cette poussée dans les boîtes de pétris (**figure 10**) :

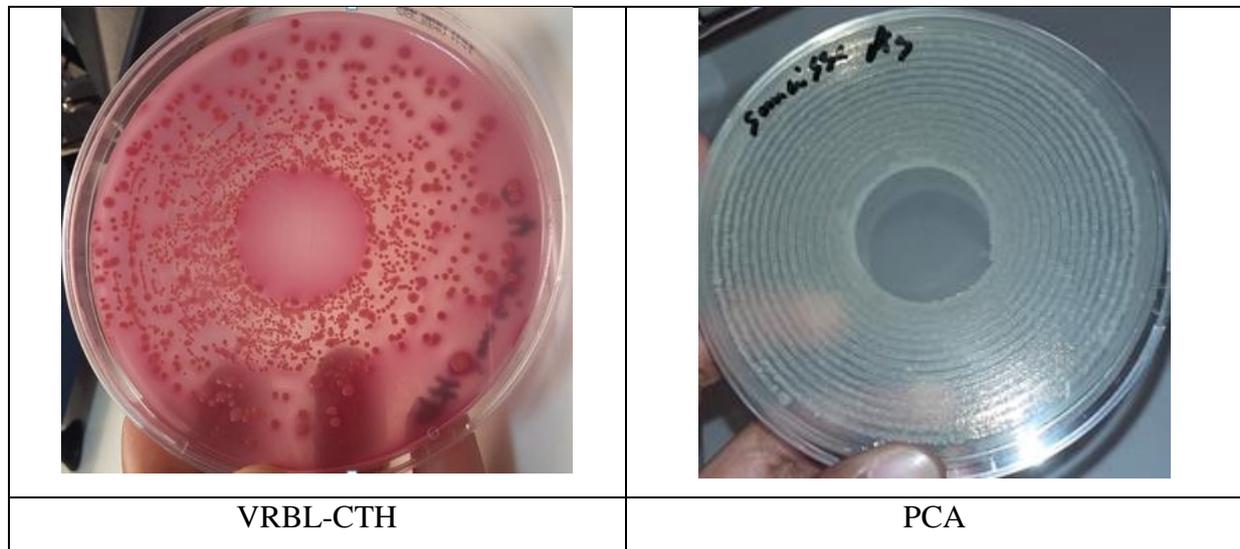


Figure 10 : La poussée des bactéries dans les différents milieux.

Ensuite on passe au dénombrement à l'aide du compteur automatique des boîtes après leur incubation (**tableaux 4 et 5**) :

Tableau 4 : Dénombrement des colonies dans le milieu VRBL-CTH.

N° de boîte de pétri	Le milieu	Le nombre de colonie
1	VRBL-CTH	$3,88.10^4$
2	VRBL-CTH	$4,70.10^4$
3	VRBL-CTH	$4,44.10^4$
4	VRBL-CTH	2.10^2
5	VRBL-CTH	7.10^3

Tableau 5 : Dénombrement des colonies dans le milieu PCA.

6	PCA	$3,50.10^4$
7	PCA	$5,56.10^4$
8	PCA	$3,06.10^4$

D'après les résultats obtenus du dénombrement on peut constater, tout en se basant sur les normes de l'arrêt ministériel que la qualité des saucisses crues analysée est toxique car selon les normes si la valeur minimale est inférieure ou égale à 100 par gramme le produit est satisfaisant et si la valeur maximale est supérieure à 5.10^2 par gramme est considéré comme produit toxique.

2. Confirmation des *E. Coli*

a. Test MAKENZI

Toutes les souches ont été testées par le test de Mackenzie qui est indole positive, en présentant un anneau rouge en surface qui témoigne d'un métabolisme du tryptophane (**Figure 11**).

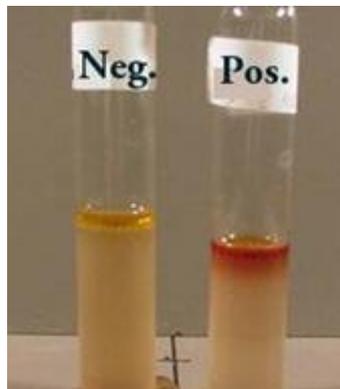


Figure 11 : Identification d'*E. Coli* par le test de Mackenzie.

b. La galerie API 20 E

Toutes les souches produisant de l'indole révélé par le test de Mackenzie ont fait l'objet de tests de confirmation par l'utilisation de la galerie API 20 E. Leur ensemencement dans la gélose TCS, un milieu nutritif permet la croissance des colonies. Malheureusement, on n'a pas eu la confirmation mais (**figure 12**) représente les résultats qu'on devrait obtenir.

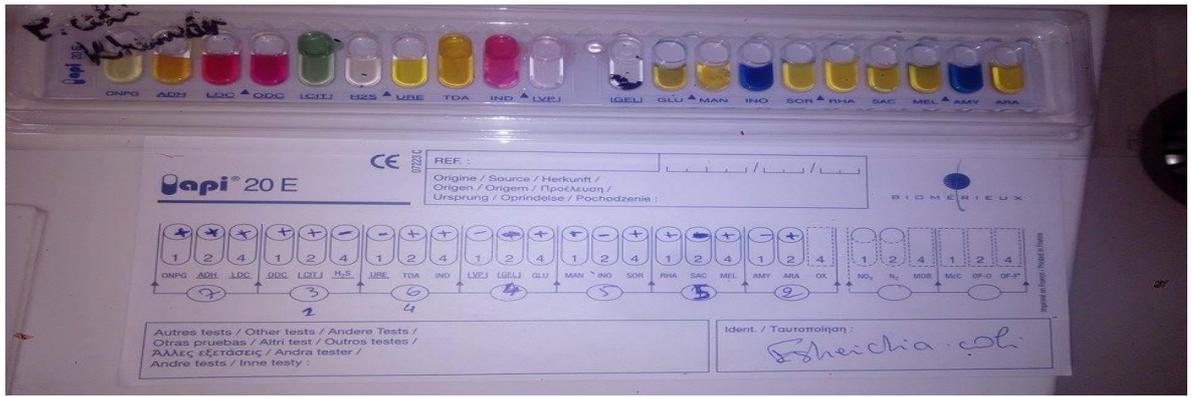


Figure 12 : La confirmation par la galerie API 20 E.

Discussion

Les maladies dues aux intoxications alimentaires collectives (TIAC) représentent au niveau mondial un nombre très élevé de décès dans les pays en voie de développement (**Kaferstein**, 1997). La contamination des aliments d'origine animale et principalement des viandes est responsable de TIAC. Selon le facteur de virulence exprimée, les *E. Coli* peuvent être à l'origine d'une diarrhée sanglante, aiguë ou persistante (**kapper**, 2004).

Les toxi-infections alimentaires liées à *E. Coli* représentent un problème mondial de santé publique. L'hygiène et la sécurité alimentaire restent un point important dans le contrôle de la propagation des *E. Coli*.

Les analyses microbiologiques des 3 saucisses crues effectuées durant la période de mon stage au sein du laboratoire de microbiologie des aliments, ont bien montré la présence d'*E. Coli* pathogène dans nos échantillons qui sont considérée comme produit toxique selon l'arrêt ministériel.

Tout en comparant les résultats obtenus avec des échantillons des saucisses cuites déjà existant au laboratoire, nous avons remarqué que dans ces derniers, il y a absence de la bactérie pathogène d'*E. Coli* car elle est détruite à haute température (65°C).

D'après cette étude, pour éviter toute contamination et prolifération microbienne, il faut assurer les bonnes pratiques de contrôle de la sécurité et la qualité des denrées alimentaires surtout d'origine animale. Ceci passe par la surveillance de la préparation de nos aliments en particulier la bonne cuisson, la maîtrise des conditions de transport, l'application des bonnes pratiques d'hygiène et le respect des températures de conservation.

Conclusion

Ces derniers temps on remarque qu'il y a un nombre très important des toxi-infections alimentaires lié à la consommation des produits de conserves, de congélation ou les fast-foods surtout dans la période d'été. Dans ce cadre nous avons fait durant la période de notre stage à l'Institut Pasteur du Maroc la recherche d'*E. Coli* dans des échantillons de saucisses crues, en procédant à son isolement et ensuite son identification par différents tests.

D'après l'analyse microbiologique des 3 saucisses crues effectuée durant la période du stage au sein du service agroalimentaire, il s'est avéré la présence d'*E. Coli* pathogène productrice de la Shiga-toxine et d'après l'arrêt ministériel, sa présence peut causer des diarrhées simples voire même hémorragiques, tout dépend de l'état immunitaire de la personne.

Afin d'éviter toute contamination, il faut respecter surtout l'application des bonnes pratiques d'hygiène et la bonne cuisson des aliments.

Références bibliographiques

- Alpha Amadou DIALLO: « *Escherichia coli* pathogènes et résistantes aux antibiotiques dans des effluents d'origine humaine et animale: Prévalence et caractérisation avant et après traitement » : Université Toulouse III-Paul Sabatier, 2013.
- Andrade et al, Andrade, J.R,V.F. Da Veiga, M.R.De Santa Rosa, and I.suassuna. “An endocytic process in Hep-2 cells induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. Med Microbiol” 28:49-57, 1989.
- Chalmers R.M, R.L. salmon, J.Evans, H.Chart,S.M.Kench, T.J.coleman, D Meadows,PMorgan-Capner, P Softley, and M Sillis. “Verocytotoxin-producing *Escherichia Coli* (VTEC): risk factors in the farming environment. Second International Symposium of the European study Group on EHEC (brussels)”. Acta Clinica Belgica 54:37, 1999.
- COHEN,N et KARIB, « H.risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : un réel problème de santé publique ? ». LES TECHNOLOGIES DE LABORATOIRE-N°1. Et KERN-BENAIBOUT Université paul-sabatier de Toulouse. TOU 3-4096, 2006.
- Doyle M.P. & Cliver D.O. *Salmonella*. “In Foodborne diseases. Academic Press Inc.”, 11, 185-204, 1990.
- Dundas S, Todd WT. “*Escherichia coli* O157 and human disease”. Curry opin Infect Dis : 171-5, 1998.
- Euzeby J.P., posting date. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire 12 juin 2007 1998-2007.
- Graham B. McBride et steven C.Chaprab. “New hydroepidemiological models of indicator organisms and zoonotic pathogens in agricultural watersheds”, Ecological Modelling, vol.222, N°13, p.2093-2102, 10 juillet 2011.
- Gourmelon michèle Recherche des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC) dans l'environnement marin (coquillages) UNIVERSITEDE RENNES I FACULTE DE PHARMACIE, 2006.
- Gabriel: Gabriel, C.R.2010 Effetes génotoxiques des souches d'*Escherichia coli* produisant la colibactine. L'Université Toulouse III – Paul Sabatier, 2010.

- kaferstein, F., Motarjemi, K., Bettcher,D.W., Foodborn disease control : A transnational challenge. *Emer. Infect. Disea.* 1997.3: 603-610.
- Kaper,J.B,Nataro,J.P. and Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*.2:123-140, 2004.
- Karmali, M. A. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.*Clin Microbiol Rev* 2 :15-38, 1989.
- Konowalchuk,J,J.I. Speirs, and S.Stavric. Vero reponse to a cytotoxine of *Eschirichia coli*. *Infect Immun* 18:775-779, 1977.
- Le Minor L.- *Salmonella*. In *Bactériologie médicale* (L. Le Minor & M. Véron, édit.). Flammarion, Paris, 411-425, 1989.
- Lepoutre A., Salomon J., Charley C. & Le Querrec F. Les toxi-infections alimentaires collectives en 1994. *Bull. épidémiol. hebd.* , 21, 93-9. 1996.
- Levine, M. *Eschirichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, entheropathoenic,enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* 155 : 377-389, 1987.
- Loukiadis : loukiadis Estelle. Facteurs de virulances et dissémination dans l'environement via les effluents d'abatoirs d'animaux de boucherie d'*Escherichia coli* entérohémmorragiques (EHEC). 2007. L'UNIVERSITE TOULOUSE III-PAUL SABATIER.
- MONTET,M,P. Contamination des aliments par les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) en France, et importance de l'acido-résistance des souches. Université Claude Bernard Lyon 1-INRA-Ecole Pratique des Hautes Etudes 2009.
- O'Brien,A,G.La Veck, D.Griffin, and M.Thompson.Characterization of shigella dysentaria 1 (Shiga) toxin purified by anti-shiga toxin affinity chromatography. *Infection and immunity* 30:170-179, 1980.
- Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of shig toxin-producing *Escherichia coli* infections.*Clin Microbiol Rev.* 1998, 11, 450-79.

- Tap.J. Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France. Unité Biodiversité Bactéries Pathogènes Emergentes. Centre nationale de références des *Escherichia coli* et *Shigella*, 2004.

- Vimont, 2007 : VIMONT, A. Optimisation de la recherche des *Escherichia coli* producteurs de shiga-toxines (STEC). UNIVERSITE CLAUDE BERNARD-LYON 1.026-2007

-X.Durrmeyera, R.Cohen, E.bingen, Y.Aujard strategies thérapeutiques des méningites néonatales à *Escherichia coli*.Archives de Pédiatre 2012;19:S140-S144.

Webographie

[1] [http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/ Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentaires-collectives](http://invs.santepubliquefrance.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-declaration-obligatoire/Toxi-infections-alimentaires-collectives)

[2] <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/escherichia-coli>

[3] <https://fr.scribd.com/doc/139540946/Enterobacteries-Generalites-Et-e-coli-Bon>

Annexes

Réactif de Kovacs :

- diméthyl-amino-benzaldéhyde.....50g
- acide chlorhydrique pur250ml
- pentanol-1 (qsp).....1000ml

Gélose Tryptone sulfite cyclosérine (TSC)

pour 1 litre de milieu :

- Tryptone.....15g
- Peptone papainique de soja.....5g
- Extrait autolytique de levure.....5g
- Métabisulfite de sodium.....1g
- Citrate ferrique ammoniacal.....1g
- D-cyclosérine.....0.4g
- Agar bactériologique.....15g
- pH=7,6± 0,2 à 25°C

Gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL)

Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande..... 7g
- Extrait autolytique de levure..... 3g
- Lactose..... 10g
- Sels biliaires.....1.5g
- Chlorure de sodium.....5g
- Rouge neutre..... 30mg
- Cristal violet.....2 mg
- Agar bactériologique..... 12g
- pH=7,4 ± 0,2 à 25°C

Gélose Plat Count Agar (PCA):

Pour 1 litre de milieu:

- Tryptone.....5g
- Extrait autolytique de levure.....2,5g
- Glucose.....1g
- Agar bactériologique.....12g
- pH=7 ± 0,2 à 25°C