

Projet de Fin d'Etudes
Licence en Biologie et Santé

Analyse Microbiologique des Aliments

Réalisé Par **Aicha ABLAD**



Pr.K.FIKRI BENBRAHIM
Dr S. SENOUCI
Pr .A.HAGGOUD

Faculté des Sciences et Techniques Fès
Institut National d'Hygiène Rabat
Faculté des Sciences et Techniques Fès

Président
Encadrante
Examineur

Année universitaire 2009-2010

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement tout ceux qui ont orienté les différentes étapes de ce travail jusqu'à son terme, par leurs estimables conseils et contributions, en particulier, Docteur Samira SNOUCI, Chef du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire Institut National d'Hygiène de Rabat.

Mes vifs remerciements vont également à Professeur Kawtar FIKRI BEN BRAHIM pour son soutien, ses conseils et ses encouragements.

Je présente ma vive reconnaissance à mes Professeurs, en général, pour leur soutien et leurs encouragements.

Enfin, je voudrais remercier les honorables membres du jury d'avoir accepté de consacrer une partie de leur précieux temps à l'évolution de mon travail.

Je remercie également mes amis ainsi que toute personne qui m'a aidé de près et de loin au cours de ce travail, et, en particulier mon Mari.

DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à :

Mes parents :

Grâce à vos tendres encouragements et grands sacrifices, vous avez su créer le climat affectueux propice à la poursuite de mes études.

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes respects, mes considérations et mon profond amour pour vous.

Je prie Dieu de vous préserver et de veiller sur vous et j'espère que serez toujours fière de moi.

Mon Mari :

Grâce à vos encouragements et votre aide en matière Informatique.

Je prie Dieu de vous préserver et de veiller sur vous et j'espère que serez toujours fière de moi.

A tous mes Professeurs et mes amis de classe :

Votre collaboration et votre aide m'ont été très précieux.

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
I.PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACEUIL.....	3
I.1.Département Microbiologie et Hygiène Alimentaire	3
I-2.Missions du Département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire.....	3
I-3.Activités du département de Microbiologie et Hygiène Alimentaire.....	4
II.MICROORGANISMES RECHERCHÉS DANS LES ALIMENTS.....	4
II.1.Flore Mésophile Aérobie Totale.....	4
II.2.Flore Fongique.....	5
II.3.Coliformes Totaux et Coliformes Fécaux.....	6
II.4.Anaérobies Sulfite Réducteurs.....	6
II.4.1 Sources de contamination et prévention.....	7
II.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	7
II.5.1.Caractères cultureux.....	7
II.5.2.Potentiel Enzymatique.....	8
II.5.3.Sources de contamination et Prévention.....	9
II.5.4.Pouvoir pathogène chez l'Homme.....	9
II.6. <i>Salmonella</i>	9
II.6.1.Caractères morphologiques.....	10
II.6.2.Sources de Contamination et Prévention.....	10
II.7. <i>Listeria monocytogenes</i>	10
II.7.1.Caractères morphologiques.....	10
II.7.2.Sources de contamination et Prévention.....	10
II.7.3.Mode d'action.....	11
II.8. <i>Campylobacter jejuni et Campylobacter coli</i>	12
II.8.1. Caractères cultureux.....	12
II.8.2.Sources de Contamination et Prévention.....	12
II.8.3.Pouvoir Pathogène.....	13
II.9. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
II.9.1.Caractères cultureux.....	13
II.9.2.Habitat.....	13
II.9.3.Pouvoir Pathogène.....	14
III.MALADIES D'ORIGINE ALIMENTAIRE.....	14
III.1.Salmonelloses.....	14
III.2.Campylobactérioses.....	15
III.3.Listerioses.....	16
Partie Matériel et Méthodes	
I.Pesée.....	18
II.Recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale.....	18
II.1.Pesée ,Dilution et Homogénéisation.....	18
II.2.Isolement et Dénombrement.....	18
III.Recherche de la Flore Fongique.....	19
III.1.Pesée,Dilution et Homogénéisation.....	19
III.2.Isolement et Dénombrement.....	19
IV.Recherche des Coliformes Totaux et Coliformes Fécaux.....	20

IV.1.Pesée,Dilution et Homogénéisation.....	20
IV.2.Isolement et Dénombrement.....	20
V.Recherche des Anaérobies SulfitoRéducteurs.....	21
V.1.Pesée, Dilution et Homogénéisation.....	21
V.2.Isolement et Dénombrement.....	21
VI. Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i>	22
VI.1.Pesée, Dilution et Homogénéisation.....	22
VI.2.Isolement et Dénombrement.....	22
VI.3. Test de confirmation.....	23
VII. Recherche de Salmonella.....	23
VII.1.Préenrichissement.....	23
VII.2.Enrichissement.....	24
VII.3.Isolement sélectif.....	24
VII.4.Identification.....	24
VIII. Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	25
VIII.1.Préenrichissement.....	25
VIII.2.Enrichissement.....	26
VIII.3.Isolement sélectif.....	26
VIII.4.Tests de Confirmation Identification biochimique.....	26
..	
CONCLUSION ET RECOMMANDATION.....	28

Références

Annexes

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 oeuvre 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**(1)**.

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 particulaire, 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)**.

I. PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'ACEUIL

L'Institut National d'Hygiène (INH) du Maroc est sous la tutelle du Ministère de la Santé et constitue l'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 (09) 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.

I.1 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 publics que pour le secteur privé et de former les techniciens des laboratoires.

I.2. 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'épidémiosurveillance des toxiinfections 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 réémergentes.

Ainsi, par la création d'unités de référence telles que l'unité de référence de *Listeria monocytogenes*, 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.

I.3. 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.

II. MICROORGANISMES RECHERCHÉS DANS LES ALIMENTS

Trois types de microorganismes sont conventionnellement recherchés, lors de l'analyse microbiologique des denrées alimentaires. Il s'agit des microorganismes responsables de l'altération, des microorganismes indicateurs de la contamination fécale et des microorganismes pathogènes responsables de toxiinfections alimentaires (4).

Parmi les microorganismes responsables de l'altération des aliments, se trouvent la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) et la Flore Fongique constituée par les Levures et Moisissures. Les microorganismes dits indicateurs de contamination fécale sont les Coliformes Totaux et les Coliformes Fécaux. Les microorganismes pathogènes responsables de toxiinfections alimentaires sont les Anaérobies SulfiteRéducteurs (ASR), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter coli*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*.

II.1. Flore Mésophile Aérobie Totale

La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) présent dans un produit ou sur une surface. L'unité de dénombrement est l'Unité Formant Colonie, car une colonie observable, sur la surface du milieu gélosé est le résultat d'un microorganisme vivant isolé à partir d'une spore ou encore d'une association de microorganismes.

Théoriquement, il s'agit alors de rechercher la flore thermophile dont la température optimale de croissance se situe à +45°C, la flore mésophile dont la température optimale de croissance se situe entre +20°C et +40°C et la flore psychrophile dont la température optimale de croissance se situe à +20°C. Leur isolement se faisant sur un milieu gélosé dit ordinaire ou nutritif, la plupart des microorganismes se développe, sauf les microorganismes exigeants et les microorganismes anaérobies stricts. Il est donc préférable de parler de Flore Mésophile Aérobie à +30°C, plutôt que de « Flore Totale » (5).

II.2. Flore Fongique

Les levures sont des organismes unicellulaires qui se divisent par fission et par bourgeonnement. Étant donné leur grande capacité d'adaptation à de nombreux substrats, les levures sont très largement répandues dans l'environnement et se retrouvent de façon normale dans le lait. Ce sont des champignons, chez les lesquels la forme unicellulaire est prédominante. Elles sont classées par genre et par espèce et sont regroupées au sein de famille, selon leur morphologie et leur mode de reproduction. Parmi elles, se trouvent, notamment, *Geotrichum Candidum* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les moisissures sont des organismes pluricellulaires qui se propagent par leurs spores. Tout comme les levures, les moisissures peuvent être véhiculées par l'environnement et se retrouver dans le lait et dans le fromage. Ce sont des microorganismes filamenteux qui sont disséminés par l'émission des spore (6). Les concentrations de moisissures ambiantes ne causent pas d'effets sur la santé de la majorité des personnes. Cependant, dans des situations où ces concentrations sont anormalement élevées ou dans le cas de certaines personnes souffrant de problèmes respiratoires ou ayant un système immunitaire déficient, l'exposition aux moisissures peut favoriser l'apparition de symptômes de maladies. Les effets ressentis dépendent des espèces présentes, de leurs produits métaboliques, de la concentration et de la durée de l'exposition ainsi que de la susceptibilité individuelle.

Les principaux effets sur la santé associés à une exposition aux moisissures sont les réactions d'hypersensibilité (allergie), les infections et l'irritation. Mais, il s'agit là de transmission par aérosols et non de d'infection par contamination alimentaire (7).

II.3. Coliformes Totaux et Coliformes Fécaux

Les coliformes fermentent le lactose à +30°C, avec production de gaz. La fermentation du lactose avec production de gaz est recherchée dans un milieu nutritif spécifique additionné de sels biliaires et de vert brillant. Parmi les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants ou fécaux fermentent le lactose, à la température de +44°C.

Les coliformes sont recherchés dans les aliments, car ce sont de bons marqueurs de l'hygiène de leurs manipulations. D'origine fécale, ils sont retrouvés dans les eaux usées et le sol. Étant des bactéries vivant dans les intestins d'animaux ou de l'Homme, leur présence indique alors une pollution fécale, dans le milieu hydrique. Ainsi, ils sont connus comme étant des organismes indicateurs de la qualité de l'eau. Cependant, ils ne provoquent pas d'intoxications alimentaires, à l'exception de *Escherichia coli* O157:H7 qui est un sérotype particulier responsable de plusieurs pathologies, dont la colite hémorragique, le syndrome hémolytique et urémique (SHU), et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). Cette bactérie, potentiellement mortelle, se trouve généralement à l'intérieur des intestins des bovins. Elle est ainsi responsable de beaucoup d'intoxications alimentaires causés par de la viande hachée dites « maladie du hamburger ». Toutefois, on a trouvé récemment cette bactérie dans des plantes vertes, tels des épinards(8).

II.4. Anaérobies SulfitoRéducteurs

Les anaérobies sulfitoréducteurs sont des microorganismes qui se multiplient, en absence d'air, au cœur des produits, leur résistance à la cuisson étant alors remarquable. *Clostridium perfringens* est l'exemple typique de microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs.

Elles deviennent pathogènes quand elles pénètrent accidentellement dans l'organisme par voie cutanée ou intestinale et y produisent leur toxine qui va ensuite altérer les fonctions de défense de l'organisme. *Clostridium perfringens* est une bactérie très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, cadavres, poussières, surface des végétaux, etc.). Elle est responsable d'intoxications alimentaires qui surviennent uniquement, après la consommation d'aliments fortement contaminés par une souche entérotoxigène. Une partie des bactéries ingérées est tuée au niveau de l'estomac (pH très acide, milieu riche en protéases, inhibition par la flore digestive résidente. Mais, l'ingestion d'un nombre important de *Clostridium perfringens* entraîne sa multiplication, dans le contenu de l'intestin grêle (10^8 - 10^9 UFC.g⁻¹). Ensuite, leur sporulation synthétise l'entérotoxine qui, libérée après lyse de la paroi bactérienne, interagit avec les entérocytes provoquant une fuite d'eau et d'électrolytes. De ce fait, *Clostridium perfringens* est retrouvé en nombre supérieur à 10^6 UFC.g⁻¹, dans les selles des malades (9).

II.4.1. Sources de contamination et Prévention

Dans les aliments, l'intoxication alimentaire est généralement lié avec des arrangements impliquant de grandes quantités de nourriture, particulièrement de plats de viande et de volaille, généralement préparés à l'avance et laissés refroidir lentement, ou insuffisamment réfrigérés. Les viandes produites laminés, les volailles farcies et les tartes offrent des conditions de croissance favorables au transfert de la contamination. La cuisson des potages, des ragoûts et des sauces créent des conditions anaérobies idéales, pendant le refroidissement, pour la germination des spores.

La maladie est le plus souvent due à l'ingestion de produits carnés, particulièrement les viandes réchauffées, qui ont été cuits préalablement en masse dans les lieux de restauration rapide.

Les mesures préventives qui peuvent être prises pour éviter la maladie sont :

- d'assurer la manutention des aliments,
- d'avoir une bonne hygiène personnelle et une formation adéquate en sécurité alimentaire,
- être pleinement conscients des risques encourus dans la cuisine à grande échelle, en particulier des plats de viande,
- s'assurer que des températures adéquates soient atteintes lors de la cuisson,
- d'assurer le refroidissement rapide des aliments cuits en les divisant en petites quantités et en réalisant leur réfrigération dans des contenants peu profonds (moins de 10 cm de profondeur),
- de stocker des aliments froids en dessous de +4°C, pour empêcher la multiplication des bactéries et des toxines produites,
- de réchauffer des aliments, jusqu'à ce que la vapeur chaude en soit dégagée,
- et, de bien laver les fruits et légumes à l'eau claire et potable avant usage (10).

II.5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est, comme tous les staphylocoques, une bactérie sous forme *cocci* à Gram positif, de 1 µm de diamètre environ, apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il est immobile, non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique.

II.5.1. Caractères cultureux

Staphylococcus aureus cultive facilement sur des milieux ordinaires, en aérobiose comme en anaérobiose, en formant, sur milieux solides, des colonies lisses, luisantes et bombées, plus ou moins pigmentées en jaune doré d'où l'appellation de staphylocoque "doré". En milieu liquide, il produit, dans le bouillon, un trouble homogène.

Staphylococcus aureus n'a pas d'exigences particulières. Si les conditions idéales de croissance sont une température de +37°C et un pH de 7,5, de grandes variations sont tolérées. Comme tous les *Micrococacceae*, il se multiplie dans des milieux contenant une concentration de 75 g.L⁻¹ de chlorure de sodium (NaCl).

II.5.2. Potentiel Enzymatique

Outre les enzymes nécessaires aux fonctions métaboliques décrites ci-dessus, *Staphylococcus aureus* a la capacité de synthétiser plusieurs enzymes telles que la catalase qui existe chez tous les *Micrococacceae*, la coagulase, la désoxyribonucléase, la phosphatase, la hyaluronidase, la fibrinolysine, la lipase et la protéolysine.

La présence d'une coagulase identifiée, en pratique courante l'espèce *Staphylococcus aureus*. La coagulase libre est une protéine diffusible, réagissant comme la prothrombine et coagulant, en quelques heures, le plasma citraté de l'Homme ou du lapin. La forme liée, réagit directement avec le fibrinogène, entraînant l'agglutination de *Staphylococcus* mis en contact avec du plasma. L'activité de toutes ces enzymes explique, en partie, la physiopathologie de l'infection staphylococcique.

Le pouvoir pathogène de *Staphylococcus aureus* tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles. L'hémolysine α ou staphylolysine α est cytotoxique et cytolytique. Elle a un effet nécrotique sur la peau lié à son effet vasoconstricteur. Quant à la leucocidine, elle agit sur les granulocytes, les macrophages et les basophiles et provoque leur immobilisation puis leur dégranulation et leur lyse.

Certaines souches de *Staphylococcus aureus* élaborent cinq toxines protéiques responsables de toxiinfections alimentaires dites entérotoxines staphylococciques A, B, C, D, E.

La toxine du syndrome de choc toxique est une toxine pyrogène et létale dite toxine du syndrome de choc toxique ou TSST (20).

II.5.3. Sources de Contamination et Prévention

Les aliments qui sont souvent impliqués dans des intoxications alimentaires à staphylocoques sont la viande et les produits à base de viande, la volaille, les œufs, des salades, le thon, les pommes de terre et les macaronis. Sont également impliqués les produits de boulangerie (11).

II.5.4. Pouvoir pathogène chez l'Homme

Staphylococcus aureus est un microorganisme pyrogène responsable de la plupart des infections suppurées de la peau et des muqueuses. Il "surinfecte" souvent les plaies négligées. Les principales staphylococcies cutanées focales sont dues à la pénétration de *Staphylococcus aureus* au niveau des annexes de la peau (follicules pilosébacés, glandes sudoripares) ou dans les muqueuses à l'occasion d'une plaie, même minime. Elles donnent lieu à des folliculites, furoncles, sycosis, anthrax, orgelets, hidrosadénites, panaris, onyxis, impétigo et abcès à localisations variées (sein, fesse, marge de l'anus, aisselle, aine). Plus rares sont les conjonctivites, les angines, les phlegmons de l'amygdale, les otites et les sinusites.

Les manifestations intestinales provoquées par les staphylocoques se présentent sous deux formes : les toxiinfections alimentaires sont les plus fréquentes : il s'agit de troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre. L'entérocite aiguë pseudomembraneuse, plus rare,

survenant chez des sujets ayant reçu une antibiothérapie qui a sélectionné une souche intestinale de *St. aureus* résistante au traitement et sécrétrice d'entérotoxine (12).

II.6. *Salmonella*

Salmonella, présente dans le tube digestif des animaux et de l'Homme et pouvant être alors à l'origine de toxiinfections alimentaires très graves, est détruite par la cuisson. Cependant, les nombreuses espèces de *Salmonella* diffèrent entre elles, quant à leur pouvoir pathogène. Bien que la plupart des espèces puissent se retrouver dans les aliments, il est essentiel de prendre en considération celles qui sont à l'origine de toxiinfections plutôt que celles qui sont à l'origine des maladies infectieuses graves (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes).

II.6.1. Caractères morphologiques

Salmonella est une bactérie en forme de bâtonnet, Gram négatif, anaérobie facultative, non sporulé, principalement mobile, avec un diamètre de 0,7 µm à 1,5 µm, une longueur de 2 à 5 µm, et des flagelles péritriches. L'obtention de leur énergie se fait par les réactions d'oxydation et les réactions de réduction, à partir de sources organiques (13).

II.6.2. Sources de Contamination et Prévention

Les sources de contamination par *Salmonella* sont le manque d'hygiène lors des manipulations, une contamination initiale de la matière première (surtout volailles, œufs) et des contaminations croisées possibles par l'intermédiaire des manipulations et/ou des surfaces de travail. La prévention contre de telles sources de contamination serait de veiller au nettoyage des mains, du matériel et des surfaces de travail et de veiller à la qualité des matières premières (14).

Par ailleurs, il est important de bien cuire les aliments, en particulier les viandes et les oeufs. Il faut aussi bien faire réchauffer les préparations déjà cuites, bien congeler et bien décongeler. Il faut toujours séparer les aliments non cuites des aliments cuits ou prêts à être consommés.

Il faut toujours éviter les contaminations croisées, en veillant à laver correctement l'endroit où des préparations ultérieures seront effectuées. Sinon d'autres aliments risquent d'être contaminés quand ils seront déposés à cet endroit (23).

II.7. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes, appartenant au genre *Listeria* et division des Firmicutes, doit son nom à Joseph Lister. *Listeria monocytogenes* est la seule espèce du genre *Listeria* pathogène pour l'Homme.

II.7.1. Caractères morphologiques

Listeria monocytogenes est un bacille de petite taille, non sporulé, anaérobie facultatif, ubiquitaire (sol, végétaux, eau), à Gram positif, synthétisant une catalase, mobile à +25°C. Elle est mobile,

grâce à ses flagelles. Selon certaines études, 1 à 10 % des humains seraient porteurs sains de *Listeria monocytogenes* dans leur intestin.

II.7.2. Sources de Contamination et Prévention

Il existe plusieurs sources possibles de transmission de la maladie. Chez l'homme, la transmission de la mère au fœtus, par la voie hématogène (listériose congénitale), peut se faire par voie digestive ou par voie respiratoire (infection amniotique, aspiration des microorganismes situés au niveau du col de l'utérus ou dans le vagin). Les infections nosocomiales sont des sources d'infections transmissibles, lors d'actes thérapeutiques. Une transmission dite directe, par un simple contact, est aussi possible. Une transmission indirecte se fait par l'intermédiaire d'un vecteur inanimé comme les produits d'origine animale (15).

Listeria monocytogenes, étant une bactérie pathogène opportuniste, attaque préférentiellement les sujets dont le système immunitaire est perturbé. C'est le cas des personnes âgées, des femmes enceintes, des nouveau-nés et des personnes immunodéprimées telles que les cancéreux, les transplantés, les personnes dépendantes aux narcotiques et au tabac, les personnes diabétiques mal équilibrés et les alcooliques. En effet, la listériose est la troisième infection néonatale, après les infections à *Escherichia coli* et *Streptococcus*.

En effet, la bactérie ingérée dans une nourriture quelconque (viande, légume, fromage..) peut traverser la paroi intestinale et induire divers symptômes tels qu'un état pseudogrippal apparemment bénin, notamment, chez la femme enceinte. Les symptômes sont plus importants chez le fœtus où la contamination *in utero*, au moment de l'accouchement, se traduit par des formes septicémiques généralisées, donnant un avortement ou des complications qui surviennent dès la naissance et/ou à des formes tardives se traduisant par une méningite. Chez les sujets fragiles, l'infection peut se traduire par des atteintes encéphalites neuroméningées. Chez les immunocompétents, peut survenir un syndrome pseudo grippal, avec fièvre, souvent inapparent.

La prévention serait la prise de précautions multiples, afin de lutter contre la listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées, d'éviter la consommation de fromages à pâte molle au lait cru, d'enlever les croûtes de fromages avant leur consommation, d'éviter la consommation de fromages vendus déjà râpés, d'éviter la consommation de poissons fumés et d'éviter la consommation de graines germées crues (soja, luzerne,...) (16).

II.7.3. Mode d'action

Listeria monocytogenes, capable de résister à la dégradation lysosomiale, par échappement des phagosomes (vésicule de phagocytose), produit des toxines qui désorganisent la membrane du phagosome. Une fois dans le cytosol, *Listeria monocytogenes* peut alors détourner le cytosquelette d'actine à son profit, pour se déplacer et se propager vers d'autres cellules en répétant les mêmes actions.

Deux des ses protéines de surface (InIA et InIB), en se fixant sur des récepteurs spécifiques (E-Cadherine et Met) du placenta, permettent à la bactérie de traverser la barrière hématoencéphalique. La bactérie passe alors d'une cellule à l'autre, en se propulsant dans la cellule infectée, en crevant la membrane plasmique de l'hôte et de la cible. Elle détourne la machinerie cellulaire et le cytosquelette d'actine, pour favoriser la polymérisation des monomères d'actine en une comète qui la propulse. La protéine (Act A), activateur des facteurs de nucléation de l'actine, qui provoque le recrutement et la polymérisation d'actine (16).

II.8. *Campylobacter jejuni* et *campylobacter coli*

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli*, espèces les plus fréquemment isolées chez l'Homme infecté ou malade, peuvent être transmis de l'animal à l'Homme, par un contact direct avec les animaux ou par le biais de la consommation ou de la manipulation de produits alimentaires d'origine animale contaminés.

II.8.1. Caractères cultureux

Campylobacter jejuni et *Campylobacter Coli* sont des bactéries thermotolérantes, à Gram négatif, très mobile, nécessitant pour une croissance optimale des conditions de microaérophie, à une température de +42°C. L'ajout d'antibiotiques sélectifs, dans les milieux d'isolement sont plus que nécessaires, à partir d'échantillons de produits alimentaires.

La sous-espèce *jejuni* et, bien plus fréquemment, isolée que la sous-espèce *doylei*. *Campylobacter jejuni* et *Campylobacter Coli* sont les 2 espèces pathogéniques d'intérêt majeur car ce sont des agents zoonotiques (16).

II.8.2. Sources de Contamination et Prévention

La source primaire des infections à *Campylobacter jejuni* ou *Campylobacter coli* chez l'Homme semble être la manipulation ou la consommation des aliments contaminés crus ou mal cuits, la viande de volaille, les contacts avec les animaux de compagnie et le bétail, la consommation d'eau contaminée ou de lait cru et les voyages dans les zones à forte prévalence, puisque considérés comme des facteurs de risque de la maladie humaine (17).

II.8.3. Pouvoir Pathogène

Une infection à *Campylobacter jejuni* peut engendrer, dans de rares cas, des neuropathies auto immunes sévères (syndromes de Guillain Barré et de Miller Fisher) provoquées par un mimétisme moléculaire entre les gangliosides (glycosphingolipides) exprimés dans la cellule nerveuse et les lipooligosaccharides présents au niveau de la membrane externe de la bactérie.

Campylobacter jejuni et *Campylobacter coli* causent des entérites qui sont beaucoup plus fréquentes chez l'enfant vivant dans des conditions d'hygiène précaires. Après une incubation de 1 à 3 jours, survient une diarrhée fébrile avec parfois du sang dans les selles ; des douleurs abdominales et des vomissements sont habituels (18).

II.9. *Vibrio parahaemolyticus*

Bactérie marine, communément associée à des toxiinfections alimentaires, *Vibrio parahaemolyticus* est associé aux produits de la mer.

II.9.1. Caractères cultureux

Vibrio parahaemolyticus est une bactérie qui se présente sous forme de Bacille, à Gram négatif, oxydase positive, aéroanaérobie facultative, halophile, ayant un optimum de croissance à +37°C, mais, pouvant croître à des températures de +5°C à +43°C. Elle peut se multiplier, dans les produits de la mer, entre +10°C et 45°C. Le pH optimal est compris entre 7,8 et 8,6. *Vibrio parahaemolyticus* synthétise deux hémolysines, une hémolysine directe thermostable (TDH) et une hémolysine apparentée à la TDH (TRH).

Dans des conditions défavorables, la bactérie rentre dans un état dit «viable, mais, non cultivable ou VNC» où elle ne peut être détectée par les techniques classiques de mise en évidence.

II.9.2. Habitat

Vibrio parahaemolyticus est présent dans l'environnement marin (notamment dans les eaux côtières et les eaux des estuaires) où il est isolé d'eaux dont la température est supérieure à 10°C. Sa multiplication est favorisée par une température supérieure à 20°C et une salinité modérée de 15 à 25 g par litre).

Le nombre de microorganismes augmente ou chute, en fonction de la température de l'eau. Lorsque celle-ci est inférieure à +10°C, l'isolement de *Vibrio parahaemolyticus* est difficile, car il rentre dans un état viable non cultivable. Les cellules prennent alors un aspect coccoïde et, au microscope électronique, elles présentent des cloques et elles ont un aspect ridé. La réversion vers les formes normales est favorisée par une augmentation graduelle de la température. Un autre facteur pouvant expliquer la diminution du nombre de bactéries dans les eaux froides est liée à la prédation par les bactéries du genre *Bdellovibrio*.

En effet, le pouvoir lytique des *Bdellovibrio* spp. vis-à-vis de *Vibrio parahaemolyticus* est important dans les eaux froides et il devient pratiquement nul dans une eau à +35°C. L'isolement de *Vibrio parahaemolyticus*, à partir d'eau douce ou d'eau de mer récoltée au large des côtes est rare. Dans l'eau douce, il est associé à des particules organiques, il ne peut être isolé que durant les mois

chauds et sa densité est toujours faible et moins de 5 UFC par litre. Au large des côtes, la plus forte salinité de l'eau, le manque de nutriment et une basse température ne sont pas favorables à sa survie.

II.9.3. Pouvoir Pathogène

Les infections intestinales sont liées à la consommation de coquillages (notamment des huîtres), de crustacés (notamment des crabes) ou de poissons crus ou insuffisamment cuits. Les malades présentent une diarrhée aqueuse, des crampes abdominales, des nausées, des vomissements, des maux de tête et, dans environ la moitié des cas, une fièvre modérée. Dans les formes les plus graves, il y a du sang dans les selles et un ténesme. La maladie se déclare 12 à 24 heures, après l'ingestion d'un aliment contaminé.

Des septicémies, consécutives à la consommation de produits de la mer ou à une infection des plaies, sont observées chez des malades présentant souvent une pathologie sous-jacente telle que alcoolisme, diabète, maladies hépatiques, neutropénie.

Des infections oculaires et des otites, consécutives à des baignades sont également décrites. Exceptionnellement, on note des infections urinaires et des péritonites consécutives à une chirurgie intestinale, chez des patients ayant préalablement consommés des produits de la mer **(19)**.

III. MALADIES D'ORIGINE ALIMENTAIRE

Une maladie d'origine alimentaire est une affection, en général, de nature infectieuse ou toxique, provoquée par des agents qui pénètrent dans l'organisme par le biais des aliments ingérés **(20)**.

III.1. Salmonellose

C'est une maladie provoquée par les bactéries du genre *Salmonella*. Une quantité de 10^5 à 10^8 *Salmonella* peut déclencher une infection. Lorsqu'un nombre suffisant de bactéries réussit à survivre à l'acidité de l'estomac, elles parviennent éventuellement aux intestins et se multiplient. *Salmonella* envahit alors la paroi intestinale et provoque une inflammation. Elle produit également des entérotoxines irritantes qui agissent sur l'intestin. Les effets combinés de l'inflammation intestinale et des entérotoxines créent un déséquilibre qui provoque la diarrhée.

La période d'incubation de la maladie est de 8 à 14 jours. Le début de la maladie, progressif, se manifeste avec une fièvre, des maux de tête, des douleurs articulaires et des douleurs abdominales. Si elle n'est pas traitée, la maladie progresse et plusieurs complications peuvent survenir dont une hémorragie digestive, une perforation intestinale, une pneumonie et une infection aiguë de la vésicule biliaire **(21)**.

Les salmonelloses peuvent revêtir trois aspects : des formes septicémiques, digestives et extradiigestives. Les formes septicémiques sont dues à *Salmonella Typhi* et *Salmonella paratyphi*

A, B et rarement C. Ce sont des septicémies à point de départ lymphatique. Les symptômes sont les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes. Chez le nouveau né ou le jeune enfant, d'autres sérotypes comme *Salmonella* Panama ou *Salmonella* wien peuvent être responsables de septicémies qui mettent en jeu le pronostic vital.

Quant aux toxi-infections alimentaires à *Salmonella* des formes digestives, elles se manifestent par des diarrhées, de la fièvre, et des vomissements. Les premiers signes surviennent 8 à 10 heures après l'ingestion de l'aliment contaminé. L'évolution de ces gastroentérites est en règle générale spontanément favorable en quelques jours. Les entérites à *Salmonella* s'observent principalement chez le jeune enfant. Des épidémies peuvent même survenir dans des collectivités de nourrissons.

Les formes extradiigestives sont plus rares et surviennent plus volontiers, chez des malades immunodéprimés, les déficits enzymatiques des globules rouges et drépanocytose sont des circonstances favorisantes (22) .

Dans plus de 90% des cas, c'est la consommation d'un aliment contaminé qui est en cause. Il s'agit principalement de la viande, des produits laitiers et des oeufs. Cependant, tout aliment est susceptible de véhiculer *Salmonella*. Une hygiène parfaite lors de la préparation des repas est donc essentielle, pour se prévenir contre la contamination. La prévention repose sur une bonne hygiène des mains, surtout lors de la préparation des aliments, et, plus particulièrement, avant de passer à la préparation d'une autre catégorie d'aliments.

III.2. Campylobactérioses

La campylobactériose est une gastroentérite due à une infection par une bactérie du genre *Campylobacter*. Ce type de gastroentérite concerne 5% à 10% de l'ensemble de gastroentérites. Plusieurs espèces de *Campylobacter* en sont responsables. Il s'agit de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* (plus rarement) et *Campylobacter lari* (encore plus rarement).

La durée d'incubation des gastroentérites inflammatoires à *Campylobacter* est de 2 à 10 jours. Les symptômes présentés par les patients sont des diarrhées abondantes et purulentes (contenant du pus) et quelquefois sanguinolentes, des douleurs abdominales, des myalgies (douleurs musculaires) et une hyperthermie (23).

III.3. Listérioses

La listériose, maladie causée par *Listeria monocytogenes*, touche essentiellement les sujets de moins d'un an et de plus de 55 ans, et, parfois des sujets en bonne santé. Cependant, d'autres maladies particulièrement celles qui diminuent l'immunité cellulaire facilitent l'apparition de la listériose comme le cancer, la corticothérapie prolongée, les médicaments cytotoxiques, la radiothérapie, l'alcoolisme, les maladies cardiovasculaires, le diabète et la tuberculose.

Le mode de contamination habituel de l'adulte est l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminées comme en témoignent les épidémies liées à la consommation de salade, de lait, de glaces et de fromage frais.

L'infection par contamination directe s'observe dans la contamination professionnelle chez les bouchers, les employés d'abattoirs et les vétérinaires et, par la transmission de la femme enceinte infectée à son enfant, soit par voie transplacentaire, soit pendant l'accouchement. L'infection transplacentaire entraîne une septicémie listérienne mortelle. Le fœtus naît mort ou prématuré, pratiquement porteur d'une listériose qui lui est fatale, tandis que la listériose acquise, pendant la délivrance, ne se déclare en règle générale, qu'une à deux semaines après l'accouchement et se présente habituellement comme une méningite **(24)**.

MATERIEL ET METHODES

Les prélèvements des échantillons alimentaires, 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 et sérologique.

I. Pesée

Il faut disposer de 25 g de l'échantillon à analyser, pour la recherche de *Salmonella*, 25g de l'échantillon à analyser, pour la recherche de *Listeria monocytogenes* et une quantité équivalente, pour l'isolement et le dénombrement de tous les autres microorganismes recherchés selon les critères nationaux et internationaux en vigueur. Soit, un minimum de 75 g, au total.

II. Recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale

La recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

II.1. Pesée, Dilution et Homogénéisation

1. Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 mL du milieu liquide électif dit Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

II.2. Isolement et Dénombrement

1. Déposer, 1 mL de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans une boîte de Pétri stérile.
2. Ajouter, par incorporation, 15 mL du milieu gélosé nutritif Plate Count Agar (PCA) fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
3. Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
4. Recouvrir, l'ensemble ainsi obtenu, d'une deuxième couche dite protectrice de 5 mL du milieu gélosé nutritif Plate Count Agar (PCA) fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.

5. Laisser se solidifier.
6. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+30,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, durant 24 Heures à 72 Heures.
7. Dénombrer les colonies petites et blanches caractéristiques de la Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) sur le milieu gélosé nutritif Plate Count Agar (PCA) (Photo 1).
8. Exprimer les résultats en $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$.

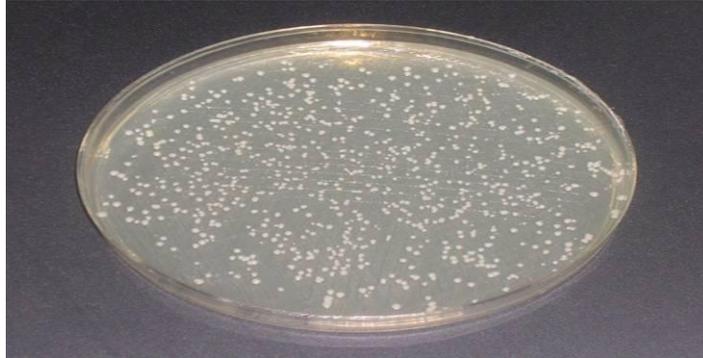


Photo N° 1 : Flore Mésophile Aérobie Totale sur Plate Count Agar (PCA) (Photo INH 2010)

III. Recherche de la Flore Fongique

La recherche de la Flore Fongique (FF) ou Levures et Moisissures se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

III.1. Pesée, Dilution et Homogénéisation

1. Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 mL du milieu liquide électif Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

III.2. Isolement et Dénombrement

1. Déposer, 0,1 ml de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans une boîte de Pétri stérile contenant du milieu gélosé sélectif Sabouraud (Sb) préalablement coulé.
- 2.ensemencer, par épuisement, à la surface du milieu gélosé sélectif Sabouraud.
3. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+25,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, durant 24 Heures à 72 Heures.
4. Dénombrer les colonies petites et blanchâtres caractéristiques de la Flore Fongique (FF) sur le milieu gélosé Sabouraud (Sb) (Photo 2).
5. Exprimer les résultats en $\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$.



Photo N° 2 : Flore Fongique (FF) sur milieu gélosé sélectif Sabouraud (Sb) (Photo INH 2010)

IV. Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux

La recherche des Coliformes Totaux (CT) et des Coliformes Fécaux (CF) se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

IV.1. Pesée, Dilution et Homogénéisation

1. Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 mL du milieu liquide électif dit Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

IV.2. Isolement et Dénombrement

1. Déposer, 1 mL de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans deux boîtes de Pétri stériles.
2. Ajouter, par incorporation, 15 mL du milieu gélosé sélectif Désoxycholate Lactose 1‰ (DL 1‰) fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
3. Mélanger l'inoculum au milieu et le laisse solidifier.
4. Recouvrir, l'ensemble ainsi obtenu, d'une deuxième couche protectrice de 5 mL du milieu gélosé sélectif Désoxycholate lactose 1‰ (DL 1‰) fondu et ramené à $+47,0^{\circ}\text{C}\pm 2,0^{\circ}\text{C}$.
5. Laisser se solidifier.
6. Incuber, une boîte, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pour les Coliformes Totaux et une boîte, à $+44,00^{\circ}\text{C}\pm 0,25^{\circ}\text{C}$, pour les Coliformes Fécaux, durant 24 Heures à 48 Heures.
7. Dénombrer les colonies rouge brique caractéristiques des Coliformes Totaux et des Coliformes Fécaux sur le milieu gélosé sélectif Désoxycholate lactose 1‰ (DL 1‰) (Photo 3).
8. Exprimer les résultats en UFC.g^{-1} .

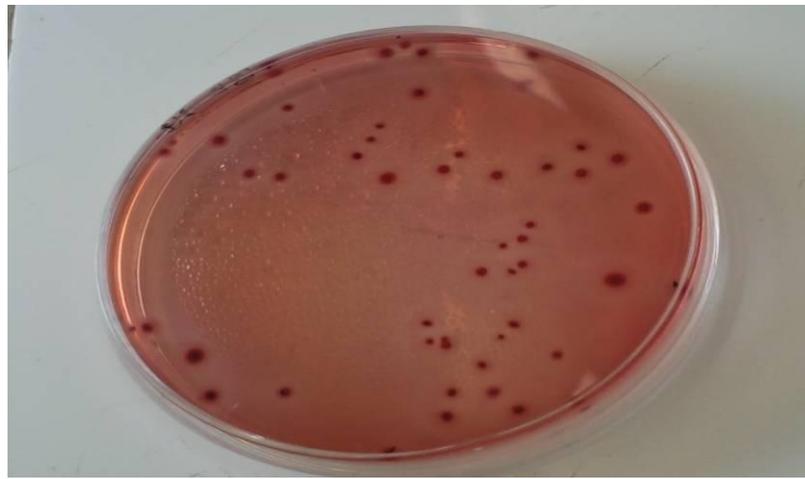


Photo N° 3 : Coliformes sur Désoxycholate Lactose 1‰ (Photo INH 2010)

V. Recherche des anaérobies sulfitoréducteurs

La recherche des anaérobies sulfitoréducteurs se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

V.1. Pesée, Dilution et Homogénéisation

1. Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 ml du milieu liquide électif Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

V.2. Isolement et Dénombrement

1. Transférer, 1 mL de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, dans un tube stérile contenant du milieu gélosé sélectif Sulfadiazine Polymyxine Sulfite (SPS), préalablement fondu.
2. Incuber, les tubes ainsi préparés, à $+46,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures à 48 Heures.
3. Dénombrer les colonies noires caractéristiques des anaérobies sulfitoréducteurs sur le milieu gélosé sélectif Sulfadiazine Polymyxine Sulfite (SPS) (Photo 4).
4. Exprimer les résultats en UFC.g-1.



Photo N° 4 : Colonies anaérobies sulfitoréducteurs sur Sulfadiazine Polymyxine Sulfite (Photo INH 2010)

VI. Recherche de *Staphylococcus aureus*

La recherche de *Staphylococcus aureus* se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution et l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement et la confirmation.

VI.1. Pesée, Dilution et Homogénéisation

1. Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 mL du milieu liquide électif dit Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

VI.2. Isolement et Dénombrement

1. Ensemencer, 0,1 mL de la suspension mère et/ou des dilutions décimales, par épuisement, sur la surface du milieu gélosé sélectif Baird Parker.
2. Incuber, la ou les boîtes ainsi préparées, à $+36,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures à 48 Heures.
3. Dénombrer les colonies noires, brillantes, entourées d'un halo clair, présomptives de *Staphylococcus aureus* sur le milieu gélosé sélectif Baird Parker (Photo 5).
4. Exprime les résultats en UFC.g-1.

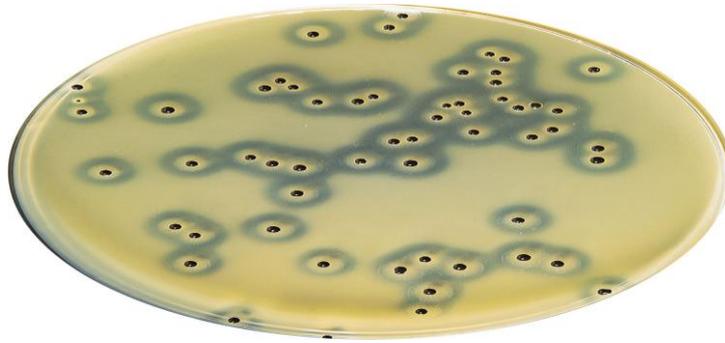


Photo N° 5 : *Staphylococcus aureus* Présomptif sur milieu gélosé sélectif Baird Parker (Photo INH 2010)

VI.3. Test de Confirmation

1. Repiquer cinq colonies caractéristiques de *Staphylococcus aureus* dans le bouillon cœur cerveau Brain Heart Infusion ou BHI.
2. Incuber, l'ensemble ainsi préparé et bien homogénéisé, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 18 Heures.
3. Effectuer le Test de Coagulase, en transférant 0,5 mL de culture BHI ainsi incubé à 0,5 mL de plasma de lapin.
4. Incuber, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$.
5. Lire, après 1 Heure, 2 Heures, ... et, jusqu'à 24 Heures.
6. Si, il y a formation d'un culot ferme, le Test de la Coagulase est dit positif, il y a donc présence de *Staphylococcus aureus*, et, si il y a absence de culot, le Test de la Coagulase est alors négatif, ce qui note l'absence de *Staphylococcus aureus* dans l'échantillon analysé.

VII. Recherche de *Salmonella*

La recherche de *Salmonella*, à partir des aliments, nécessite quatre étapes obligatoires qui sont le préenrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification biochimique et sérologique.

VII.1. Préenrichissement

1. Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 ml du milieu liquide électif Eau Peptonée Tamponnée (EPT), à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
4. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+36, 0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 8 Heures à 12 Heures.

VII.2. Enrichissement

1. Transférer, à l'aide d'une pipette stérile, 0,1 mL du milieu liquide pré enrichi dans 10 mL de milieu liquide sélectif Rappaport-Vassiliadis (RV).
2. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+42,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 18 Heures à 24 Heures.

VII.3. Isolement sélectif

1. Ensemencer, une œse du milieu liquide enrichi, par striation, sur un milieu gélosé sélectif Hektoen.
2. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures.

Les colonies caractéristiques de *Salmonella* sur le milieu gélosé sélectif Hektoen sont de couleur bleu vert (non utilisation du saccharose) avec (production de sulfure de fer) ou sans (absence de production de sulfure de fer) centre noir (Photo 6).



Photo N°6 : Colonies de *Salmonella* sur milieu gélosé sélectif Hektoen (Photo INH 2010)

VII.4. Identification

1. Ensemencer, 5 colonies caractéristiques de *Salmonella* sur le milieu gélosé en pente kligler, en piquant au fond du tube (glucose), puis en faisant des stries, au niveau de la pente (lactose).
2. Incuber, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures.
3. Après incubation, quatre caractères cultureux de *Salmonella* sont mis en évidence (Photo 7).



Photo N°7 : Profil Biochimique de *Salmonella* sur milieu gélosé sélectif Kligler (Photo INH 2010)

- *Salmonella* utilise le glucose comme source de carbone. Le culot est jaune, coloration due à l'acidification du milieu.
- *Salmonella* n'utilise pas le lactose comme source de carbone. La pente reste rouge, en raison de l'absence de fermentation et donc absence l'acidification du milieu.
- *Salmonella* produit (présence de couleur noire) ou ne produit pas (absence de couleur noire) de sulfure d'Hydrogène (H₂S).
- *Salmonella* produit (présence de bulles) ou ne produit pas (absence de bulles) de gaz.

Une identification sérologique, basée sur l'utilisation des sérums polyvalents et monovalents somatiques et flagellaires, est effectuée selon le schéma de Kaufmann-White.

VIII. Recherche de *Listeria monocytogenes*

La recherche de *Listeria monocytogenes* nécessite quatre étapes obligatoires qui sont le pré enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification biochimique et sérologique.

VIII.1. Pré enrichissement

1. Prélever, aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
2. Ajouter, aseptiquement, dans un sac en plastique stérile, 225 mL du milieu liquide sélectif dit Fraser Demi, à l'unité d'analyse préalablement pesée.
3. Mélanger au Stomacher (agitateur), pendant 4 minutes à 5 minutes, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
4. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à +36,0°C±1,0°C, pendant 18 Heures.

VIII.2. Enrichissement

1. Transférer, à l'aide d'une pipette stérile, 0,1 mL du milieu liquide pré enrichissement dans 10 mL de milieu liquide sélectif dit Fraser.
2. Incuber, l'ensemble ainsi préparé, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 18 Heures à 24 Heures.

VIII.3. Isolement Sélectif

1. Ensemencer, une oese du milieu liquide enrichissement, par striation, sur un milieu gélosé sélectif dit Palcam et un milieu gélosé sélectif dit Oxford.
2. Incuber, les deux boîtes ainsi préparées, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures à cinq jours.

Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* sur le milieu gélosé sélectif Palcam (Photo 4) sont noires et incurvées et les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* sur le milieu gélosé sélectif Oxford sont rondes, grandes, régulières et transparentes (Photo 8).



Photo N°8 : *Listeria monocytogenes* sur Oxford (gauche) et Palcam (droite) (Photo INH 2010)

VIII.4. Tests de Confirmation Identification Biochimique

1. Repiquer cinq colonies suspectes (5 colonies) caractéristiques de *Listeria*, dans un tube contenant 5 mL de milieu liquide Tryptone Soja Extrait de Levure (TSYE).
2. Incuber, l'ensemble ainsiensemencé, à $+36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 24 Heures.
3. Ensemencer, une boîte de milieu gélosé Tryptone Soja Extrait de Levure (TSAYE), à partir d'une oese du milieu liquide Tryptone Soja Extrait de Levure (TSYE).
4. Incuber, la boîte ainsiensemencée, à $36,0^{\circ}\text{C}\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, pendant 18 Heures à 24 Heures.

5. Effectuer une coloration de Gram, à partir d'une colonie caractéristique sélectionnée sur le milieu gélosé Tryptone Soja Extrait de Levure (TSAYE). *Listeria* apparaît sous forme de bacilles fins et courts, à Gram positif.
6. Effectuer une réaction à la catalase, à partir d'une colonie caractéristique sélectionnée sur le milieu gélosé Tryptone Soja Extrait de Levure (TSAYE), par la mise en suspension sur une lame dans une goutte de peroxyde d'oxygène. La formation de bulles indique une réaction positive.
7. Effectuer l'examen de la mobilité, à l'état frais, entre lame et lamelle, à partir d'une colonie caractéristique sélectionnée sur le milieu gélosé Tryptone Soja Extrait de Levure (TSAYE). *Listeria* apparaît sous forme de bacilles fins et courts, animés d'une mobilité en pirouette.
8. Effectuer la confirmation de l'espèce, à partir d'une colonie caractéristique sélectionnée sur le milieu gélosé Tryptone Soja Extrait de Levure (TSAYE), par l'identification des caractères biochimiques, à l'aide de galeries *Listeria* System 18 R (Photo 9).



Photo N°9 : Identification de *Listeria monocytogenes* par la Galerie API System 18 R

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

L'analyse microbiologique des aliments a un rôle important qui répond à deux nécessités qui sont la prévention et l'expertise.

La prévention permet de tester un aliment, pour savoir s'il est consommable du point de vue microbiologique, c'est-à-dire s'il ne contient pas de bactéries susceptibles de l'altérer (mauvais goût, mauvaise odeur, mauvaise apparence, ...) ou de microorganismes pathogènes et/ou toxigènes responsables de toxiinfections alimentaires.

Quant à l'expertise, elle permet de déterminer si un aliment est sûr et salubre.

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.

Les dix commandements permettant le respect de l'hygiène alimentaire sont Prévenir, Assainir, puis Prévenir et Assainir (Tableau 1):

Tableau 1 : Les dix commandements permettant le respect de l'hygiène alimentaire

Prévenir	Eviter les apports en microorganismes	<p>1- (Où) Ne mettre en oeuvre qu'un équipement adapté (locaux et matériels) et en parfait état.</p> <p>2 - (Quoi) N'utiliser que des produits sains et les protéger. Attention aux mélanges de denrées d'origines différentes. Produits animaux, denrées crues, toujours suspects.</p> <p>3 - (Qui) Surveiller étroitement la santé et l'hygiène du personnel (porteurs sains, plaies aux mains, hygiène corporelle et vestimentaire, propreté, danger fécal).</p> <p>4 - (Comment) Éviter le contact des denrées saines avec les secteurs souillés, manipuler correctement, ne pas parler, ne pas fumer, ne pas cracher, savoir goûter et se laver, réaliser un nettoyage et une désinfection rigoureux.</p> <p>5 - (Temps) Denrées de conservation limitée, la consommation doit être la plus rapprochée possible de la préparation.</p>
	Limiter la multiplication	<p>6-(Anti-tiède) La zone de danger (de +65°C à +10°C) doit être traversée dans les deux sens très rapidement (moins de deux heures).</p> <p>7-(Chaud) Respecter la chaîne du chaud, maintenir la température supérieure à +65°C de la cuisson à la consommation.</p> <p>8-(Froid) Respecter la chaîne du froid, maintenir la température entre à 0°C et +3 °C, pour les produits réfrigérés (durée de conservation limitée) et au-dessous de -18 °C, pour les produits surgelés (longue conservation, ne pas recongeler après décongélation).</p>
Assainir	Détruire les microorganismes	9-Respecter les conditions de cuisson (barème temps température) stérilisation ou la pasteurisation.
Prévenir et Assainir	Conditions nécessaires à l'application	<p>10 - Réglementation</p> <p>Contrôle de toute la chaîne : produits, matériels, processus, personnel...).</p> <p>Formation (et information) du personnel en vue de le motiver et de l'impliquer (responsabilisation).</p>

D'après un document de R .ROSSET Directeur du CNERPAC (In : 25).

Références :

- (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) ANONYME : Micro-organisms in foods (1) ; Their significance and methods of enumeration, 434 pages,
University of Toronto Press Editeur, Toronto 1978.
- (5) Récupérée de l'URL :
[http://fr.wikibooks.org/wiki/Analyse_microbiologique_des_aliments/Le_d%C3%A9nombrement_de_la_Flore_M%C3%A9sophile_A%C3%A9robique_Totale_\(FMAT\)](http://fr.wikibooks.org/wiki/Analyse_microbiologique_des_aliments/Le_d%C3%A9nombrement_de_la_Flore_M%C3%A9sophile_A%C3%A9robique_Totale_(FMAT))
- (6) Les groupes microbiens d'intérêt laitier. 1992. coordonné par J.Hermier, J.Lenoir & F.Weber.Edition
CEPIL-Paris.
- (7) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) (1999).
- (8) Nestlé Recall Leaves A Mystery in Its Wake, Washington Post, 21 juin 2009
- (9) Labbe R.1989 Clostridium perfringens. In Foodborne Bacterial Pathogens, Doyle M. P. (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp191-234.
(http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/officiels/afssa/Cperf090207.pdf)
- (10) Section des permis de la Santé, les inspections et l'unité d'exécution, le Conseil municipal de Christchurch
- (11) Institut Nouvelle-Zeland pour la compagnie agricole et de la recherche alimentaire limited un institut de la recherche de la couronne Bermer PJ ,Fletcher GC&obsorne Avril 2004.
- (12) Dr.B.Nezarhttp://bedi-pharm.site40.net/wp-content/uploads/2009/03/les_staphylocoques.ppt#261,6,Diapositive_6.
- (13) RA Giannella (1996). "Salmonella» . in Baron S et al (eds.). Baron's Medical Microbiology (4th ed.). Baron S et al (eds.). baron de la microbiologie médicale (4 e éd.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1 . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.1929> . Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- (14) <http://www.ac-orleans-tours.fr/difor-haccp/ressources/interpretation.htm>.
- (15) Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis.
- (16) Manuel terrestre de l'OIE 2005 chapitre (2.10.8).
- (17) FRIEDMAN C.R.NEIMANN J.,WEGENER H C & TAUX R .V.(2000). Epidemiology of campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations .in : campylobacter ,Second Edition,Nachamkin I & M.J.Blaser, eds.ASM Press ,Washington DC,USA,121-138.
- (18) RA Giannella (1996). "Salmonella». in Baron S et al (eds.). Baron's Medical Microbiology (4th ed.). Baron S et al (eds.). Baron de la microbiologie médicale (4 e éd.). Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section.1929> . Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- (19) Zahraoui, A. 2005. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/parahaemolyticus.html>.

(20) Récupérée du l'URL : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/fr>.

(21) Récupérée du l'URL :

http://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=salmonellose_pm

(22) J .L ,AVRIL ; H .DABERNAT ; F.DENIS ; H .MONTEL,1999 Bactériologie clinique 2^{ème} édition.

(23) Récupérée du l'URL : <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/campylobacteriose-9004.html>.

(24) MAAZOUZI W.1997 livre : « Hygie ou livre de la prévention ».

(25) Joffin,C .et J.N.Joffin .1999.Mic .Alimentaire .Centre Régional de Documentation pédagogique d'Aquitaine ED.

Annexes

Compositions des milieux

+ Plate count agar (PCA) :

➤ Composition :

Peptone 5g
Extrait de levure 2.5g
Glucose 1g
Agar-agar 15g
PH: 7 .

+ Desoxycolate Lactose 1pour 1000 :(DL)

➤ Composition (g/l) :

Agent nutritives

Peptone de viande 5
Extrait de viande 5
Lactose 10
Eau 1000 ml

Agents inhibiteurs :

Citrate ferrique ammoniacal 1
Thiosulfate de sodium 5.4
Citrate de sodium 6
Désoxycholate de sodium 3

Indicateur colore :

Rouge neutre 0.02
PH : 7.5

+ Sulfite polymixine sulfadiazine(SPS)

➤ Composition (g/l) :

Peptone de caséine 15
Extrait de levure 10
Fer III de citrate 0.5
Sulfate de polyxine 0.01
Sulfite de sodium 0.5
Sulfadiazine de sodium 0.12
Agar-agar 13.9

+ Eau peptonee tamponnee (EPT)

➤ Composition (g/l) :

Peptone de caséine 10
Chlorure de sodium 5

Phosphate de sodium 3.5
Phosphate de potassium 1.5
pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

Fraser demi

➤ Composition (g/l) :

Polypeptone 10
Extrait autolytique de levure 5
Extrait de viande 5
Chlorure de sodium 20
Phosphate disodique anhydre 9.6
Phosphate monopotassique 1.35
Chlorure de lithium 3
Acide nalidixique 3
Acriflavine 25
Citrate de fer III ammoniacle 0.5
PH : 7.2

Fraser

➤ Composition

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone 10 g
- Extrait autolytique de levure 5 g
- Extrait de viande 5g
- Chlorure de sodium 20g
- Phosphate disodique anhydre 9.6g
- Phosphate monopotassique 1.35g
- Esculine 1g
- Chlorure de lithium. 3g
- Acide nalidixique..20 mg.
- Acriflavine (chlorhydrate) 25mg.
- Citrate de fer III ammoniacal 0.5g.

pH à 25°C : 7,2

Baird Parker :

➤ Composition (g/l) :

Agent nutritives :

Extrait de viande 5
Peptone de caséine 10
Extrait de levures 1
Agar agar 15
Eau 950ml

Agents inhibiteurs :

Pyruvate de sodium 10
Glycine 12
Chlorure de lithium 5
Emulsion de jaune d'œuf – tellurite 50ml
PH : 6.8 0 25°C

Palcam

➤ Composition (g/l)

Agents nutritifs

Peptone 23
Amidon 1

Chlorure de sodium 5
Agar-agar 13
Mannitol 10
Ammonium fer III citrate 0.5
Esculine 0.8
Glucose 0.5
Eau minéralisée 500 ml
Eau distillée 1

Agents inhibiteurs

Chlorure de lithium 15
Sulfate de polymyxine 5mg dans 500ml
Ceftazidime 10 mg dans 500ml
Indicateur coloré : rouge de phénol 0.0

PH :7

 Oxfor

➤ **Composition :**

Pour un litre de milieu
Polypeptone 20 g
Extrait autolytique de levure 3g
Amidon 1g
Chlorure de sodium 5g
Esculine 1g
Citrate ferrique ammoniacale 0.5g
Chlorure de lithium 15g
Colistine (sulfate) 20g
Céfotétan 2 mg
Fosfomycine 10 mg
Acridavine 5mg
Agar agar bactériologique 13g
PH :7 à 25°C

 Rappaport vasiliadis

➤ **Composition :**

Pour un litre de milieu :
Peptone papainique de soja 4.5g
Chlorure de sodium 7.20g
Phosphate monopotassique 1.26g
Phosphate dipotassique 0.18g
Chlorure de magnésium anhydre 13.4g
Vert malachite (oxalate) 36.0 g
PH : 5.2

 Hektoen

➤ **Composition :**

Pour un litre de milieu
Peptone pepsique de viande 12g
Extrait autolytique
de levure 3g
Lactose 12g
Saccharose 12g
Salicine 2g
Sels biliaires 9g
Chlorure de sodium 5g
Thiosulfate de sodium 5g
Citrate ferrique ammoniacal 1.5g
Bleu de bromothymol 65mg

Fuchsine acide 40mg

Agar agar 13.5mg

PH :13.5

 **Kligler**

➤ **Composition :**

Agents nutritifs

Peptone de caséine 15

Peptones de viande 5

Extrait de viande 3

Extrait de levures 3

Chlorure de sodium 5

Lactose 10

Glucose 10

Agar agar 12

Eau 1000ml

Agents sélectifs

Citrate de fer III ammoniacle 0.5

Thiosulfate de sodium 0.5

Indicateur coloré : rouge de phénol

 **Sabouraud**

➤ **Composition :**

Peptone 10g/l

Glucose 40 g/l

Chloramphénicol 50 mg

Agar-agar 17 g/l

Eau 1000 ml

PH : 5.6

 **Bouillon cœur -cervelle (BHI)**

➤ **Composition :**

Pour un litre de milieu

Extrait cœur cervelle 17.5g

Peptone pancréatique de gélatine 10g

Chlorure de sodium 5g

Phosphate de disodique 2.5g

Glucose 2g

PH : 7.4