

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université M'hamed Bougara Boumerdes

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Département : Génie des procédés.

Filière : Génie alimentaire

Option : Génie alimentaire

THEME : LES STAPHYLOCOQUES PATHOGENES DANS LES PRODUITS LAITIERS

Présenté par :

📧 CHELLAL Dalila

📧 MECIOURI Messaouda

Soutenu le : 03/06/2018

Jury:

Président : M. Duslimani.n

Examineur: Melle Smaili.s

Examineur :M.Bouazize.f

Promoteur :M. Annou .S

grade

UMBB

UMBB

UMBB

Résumé

Les staphylocoques en général et les staphylocoques aureus en particuliers sont des bactéries pathogènes qui peuvent être malheureusement trouvés dans les aliments périssables, parmi ces aliments qui ont la tendance de se périr rapidement : les produits laitiers, les viandes et les poissons, etc. .Ces bactéries sont capables de générer des enzymes et des poisons très nocives qui peuvent nuire aux aliments et les rendre inconsommables. A l'issu de notre étude, on a trouvé que le lait de vache cru contient des staphylocoques pathogènes et généralement l'origine de cette contamination après le biotypage de nos souches, il s'est révélé que la contamination provienne de vache mammiteuse, de l'environnement ainsi que de l'home. L'antibiogramme réalisé montre que la majorité de nos souches sont résistantes à la méthicilline.

Abstract

Staphylococci in general and staphylococci aureus in particular are pathogenic bacteria that can unfortunately be found in perishable foods, among those foods that have the tendency to perish quickly: dairy products, meat and fish, etc. These bacteria are capable of generating very harmful enzymes and poisons that can harm foods and make them unconsumable. At the end of our study, we found that raw cow's milk contains pathogenic staphylococci and generally the origin of this contamination after the biotypage of our strains, it was revealed that the contamination came from mammalian cow, the environment as well as the home. The antibiogram shows that the majority of our strains are resistant to methicillin.

المكورات العنقودية بشكل عام والمكورات العنقودية الذهبية على وجه الخصوص هي بكتيريا مسببة للأمراض التي يمكن للأسف العثور عليها في الأطعمة القابلة للتلف، من بين تلك الأطعمة التي لها ميل للهلاك بسرعة: منتجات الألبان واللحوم والأسماك، الخ. هذه البكتيريا قادرة على توليد إنزيمات و سموم ضارة جدا يمكن أن تؤذي الأطعمة و تجعلها غير مستساغة.في نهاية دراستنا، وجدنا أن حليب البقر الخام يحتوي على المكورات العنقودية المسببة للأمراض وعموما أصل هذا التلوث بعد test biotypage سلالاتنا، وقد تبين أن التلوث جاء من بقرة الحلوب، البيئة وكذلك المنزل يوضح المضاد الحيوي أن معظم سلالاتنا مقاومة للميثيسيلين.

Remerciements



- ❖ *Louange à ALLAH, seigneur de l'univers qui nous a donné la force d'accomplir ce travail avec succès.*
- ❖ *Nous adressons nos vifs remerciements à notre promotrice consultante M^{ème} : ANNOU pour nous avoir guidés et orienter dans le bon chemin tout au long la durée de ce travail, nous la remercions beaucoup aussi pour sa compréhension, sa patience, ses compétences et ses remarques qui nous été précieuses.*
- ❖ *Nos chaleureux remerciements vont aussi aux enseignants de département d'alimentation sans exception pour leurs aides durant notre formation.*
- ❖ *Nos derniers remerciements vont aussi à tous ceux qui ont contribués de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

Merci



© Ladia Lynn

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à mes parents, et à mon époux qui m'a aidé et soutenu que Dieu le protège.

Comme je le dédie aussi à mon bébé adoré qu'il est considéré comme la plus belle chose que j'ai eu dans cette vie.

A ceux qui m'ont donné la vie, symbole de beauté, et de fierté, de sagesse et de patience.

- ☉ A Mes frères, et Mes sœurs, et mes nouveaux, je les réserve toujours une place dans mon cœur et mes pensées.*
- ☉ A toute ma famille : Chellal et Ouabel.*
- ☉ A toute la famille de mon époux : Mohamed merabet et salmi.*
- ☉ A tous mes Amis sans exception.*
- ☉ A tout le groupe de Génie Alimentaire.*

CHELLAL Dalila



Dédicace

*Je dédie ce modeste travail à mes parents, et à mon époux que Dieu le
Protège*

*A Mes frères, et Mes sœurs, et mes nouveaux, je les réserve toujours une place
dans mon cœur et mes pensées.*

- ☺ A toute ma famille : Meciouri*
- ☺ A toute la famille de mon époux*
- ☺ A tous mes Amis sans exception.*
- ☺ A tout le groupe de Génie Alimentaire.*

MECIOURI MESSAOUDA

Sommaire

Résumé.....	I
Remerciement	IV
Dédicace.....	V
Liste des continus.....	VI
Liste des figures	IX
Liste des tableaux.....	X
Abréviation.....	XI
Introduction	XI I
Chapitre 01: Généralité sur les staphylocoques	
1. Taxonomie.....	
1.1 Définition.....	01
1.1.1 Classification phylogénique	01
1.2 Le genre staphylococcus.....	01
1.3 Classifications des staphylocoques.....	02
1.3.1 Les staphylocoque à coagulas positif (SCP).....	02
1.3.1.1 Les staphylocoques aureus	02
a. caractère bactériologiques	03
1.3.2 Les staphylocoques à coagulase négative (SCN).....	06
2. Antibiogramme	08
2.1.Béta lactamines	08
Chapitre 02 : les Staphylocoques dans l'industrie alimentaire	
1. L'origine des S. dans les produits alimentaires	09
1.1 Matière première.....	09

1.2 Matériel.....	09
1.3 Main d'œuvre.....	09
1.4 Milieu.....	09
1.5 Méthode.....	09
2. Les Toxi-infections alimentaire (TIA) à S. aureus.....	10
2.1 Les symptômes.....	10
2.2 La prévention.....	12
Chapitre 03: Matériel et méthode	13
I. Recherche et dénombrement des staphylocoques (Milieu B-P et Chapman).....	14
1. But	14
2. Principe.....	14
3. Matériel	14
4. Mode opératoire	14
II. La catalase	15
1. But	15
2. Principe.....	15
3. Technique.....	15
4. Lecture.....	16
III. Coloration du gram.....	16
1. But	16
IV. Recherche de la staphylocoagulase libre	18
1. Principe	18
2. Matériel	18
3. Mode opératoire.....	18
4. lecture	18

V. Biotypage.....	18
1. Recherche de l'hémolysine β	18
2. Staphylokinase	19
3. Coagulation du plasma bovin.....	20
4. Test sur un milieu au cristal violet	20
IV. L'antibiogramme	21
Chapitre 04 : Résultats et discussions	
Conclusion et recommandations	32
Les références	33
Annexe 01 : Les géloses.....	38
Annexe 02 colorants.....	40
Annexe 03 : les tableaux et les normes.....	41

Listes des figures

Figure 01 : Couques de <i>Staphylococcus aureus</i> disposée en grappes de raisins ; micrographie électronique à balayage	04
Figure 02 Schémas récapitulatif de l'origine des micro-organismes dans les aliments	10
Figure 03 : observation macroscopique des Staphylocoques.....	24
Figure 04: la fréquence des différentes catégories des Staphylocoques..... Dans le lait de vache cru.	25
Figure 05 : résultats de biotypage.....	27
Figure 06: Résultats d'antibiogramme des souches testés par..... L'antibiotique oxacilline .	29
Figure 07 : Histogramme de la sensibilité des souches	31

Liste des tableaux

Tableau 01 : Différents caractères bactériologiques des <i>Staphylococcus aureus</i>	03
Tableau 02 : Caractères différentiels des principales espèces de Staphylocoques	04
Tableau 03 : Classification phénotypique des espèces et sous-espèces du genre <i>Staphylococcus</i>	04
Tableau 04 : Espèces de <i>S.</i> à coagulase (--) isolées des produits laitiers	07
Tableau 05 : Comparaison des toxi-infections alimentaires dues à <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> et <i>Clostridium perfringens</i>	11
Tableau 06 : Présentation de matériel utilisé dans le laboratoire.....	13
Tableau 07 : les étapes de coloration du gram	17
Tableau 08 : les échantillons analysés.....	22
Tableau 09 : Dénombrement sur le milieu Chapman.....	23
Tableau 10 : Identifications des résultats des staphylocoques	25
Tableau 11 : les résultats de test coagulase	25
Tableau 12 : Résultats des biotypage.....	28
Tableau 13 : la croissance microbienne en fonction de diamètre.....	30
de la zone d'inhibition.	

List des abréviations :

ADN : acide désoxyribonucléique.

ADNase : acide désoxyribonucléique.

ADNr : acide désoxyribonucléique ribosomique.

B₁ jusqu'au B₇ : Echantillons de Boudouaou (code 01 jusqu'au 07).

BP : Baird-Parker

GC : Guanine-cytosine.

HNS : hôte non spécifié.

Kda : kilodaltons.

MB : million de bases .

Nc : nombre de colonies comptés de staphylocoques présumés pathogène.

O₁ : Echantillon de Ouled-Haddje (code 01).

O₂ : Echantillon de Ouled-Haddje (code 02).

ORL : Oto-rhino-laryngologiste.

PH : Point de l'hydrogène.

S : Staphylocoques.

SA : Staphylocoques aureus.

SAK : Staphylokinase

SCN : Staphylocoques à coagulase négative.

SCP : Staphylocoques à coagulase positive.

SD : Syndrome diarrhéique.

SE : Syndrome émétique.

SNA : Staphylocoques non aureus.

TIA : Toxi-infection alimentaire.

T₁ : Echantillon de Tizi-Ouzou (code 01).

T₂ : Echantillon de Tizi-Ouzou (code 02).

Ufc : unités formant colonies.

Introduction

Les micro-organismes existent sur la terre depuis des milliards d'années avant même l'apparition des plantes et des animaux (MICHEAL et *al.* 2007).

Les premiers êtres vivants étaient les bactéries, le monde bactérien a été le seul monde vivant pendant près de deux milliards d'années. L'évolution de la diversité de microorganisme largement dépassé celle des autres organismes, cette diversité fait partie de leur nombreuses propriétés. Le domaine de Bacteria comportant tous les procaryotes pathogènes connus à ce jour ainsi que des certaines d'autres espèces non pathogènes (MICHEAL et *al.*, 2007).

Les risques d'intoxications alimentaires existent tout au long de l'année en Algérie. L'intoxication par le staphylocoque aureus occupe la deuxième place après les salmonelles. Cette maladie alimentaire est causée par l'ingestion d'entérotoxine staphylococcique (SE), elle possède des propriétés neurotoxiques chez l'homme, se sont des protéines thermorésistant préforme dans l'aliment dans lequel les staphylocoques aureus, producteurs de coagulase sont incriminées.

On trouve les staphylocoques dans le nez, la gorge et la peau, ils peuvent donc facilement contaminer les aliments, ils peuvent aussi provenir des porteurs ou des personnes atteints d'infections pyogènes (Dr Amel mameche ; 2009).

Le lait et les produits laitiers sont des produits très fragiles et ils constituent un milieu de culture pour les microbes par excellence, d'où la nécessité d'appliquer des méthodes préventives pour garantir aux consommateurs un produit de qualité hygiénique et sanitaire satisfaisante.

L'objectif de la présente étude est de confirmer par dénombrement la présence des staphylocoques aureus dans certains aliments largement consommés par la population :

- ❖ Déterminer l'origine de la contamination par le biotypage.
- ❖ Déterminer les souches résistantes à la méthicilline.

CHAPITRE 01: Généralités sur les staphylocoques

1. Taxonomie.

1.1 Définition : Les Staphylocoques ont été identifiés dès l'aube de l'ère pasteurienne par d'éminents microbiologistes à l'instar de Koch, Pasteur, Ogston et Rosenbach.

En 1878 est pour la première fois, Koch souligne le rôle pathogène de bactéries qui se présentent sous forme de cocci gram positive dans le pus d'abcès. Ils seront baptisées en 1883 par OGSTON sous le nom staphylocoques, du latin ' Staphylle' ou grappe coccus ou ' grain', en 1884 ils ont été classé en fonction de la pigmentation des colonies par ROSENBAACH (d'après sheinfer et al, 1986 Brum & Bes 2000). Ces cocci seront ensuite isolées puis identifiés d'un pus par Louis PASTEUR en 1888.

1.1.1 Classification phylogénique

Il existe plusieurs types de classification de *S. aureus* dont la plus utiliser est la

Classification de Bergey :

- ☉ Domaine : *Bacteria* ou *Eubacteria*.
- ☉ Phylum XIII : Firmicutes.
- ☉ Classe : Bacilli.
- ☉ Ordre : Bacillales.
- ☉ Familles : Staphyloccaceae.
- ☉ Genre : Staphylococcus.
- ☉ Espèces : *Staphylococcus aureus* (CAMILLE, 2007).

1.2 Le genre staphylococcus :

Les staphylococcus sont des coques à gram positive d'un diamètre d'environ un micron groupés en amas à l'examen microscopique, ils sont immobiles non sporulés et non capsulés.

Le genre comprend plus d'une 50 d'espèces et sa taxonomie est en évolution constante (d'après le loir&Gautier, 2010) C'est un groupe cohérent sur le plan phylogénétique et moléculaire, d'après l'étude comparative des séquences d'ADNr 16S (Ludwig *et al.*, 1981) et d'hybridation ADN-ADN (Kloos et Schleifer, 1986). Au niveau des caractères phénotypiques,

les staphylocoques sont à Gram positif, à catalase positive, non mobiles, asporulés, habituellement non capsulés et halotolérants. La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *Anaerobius* qui sont anaérobies strictes. De nombreux tests phénotypiques permettent de distinguer les bactéries appartenant au genre *Staphylococcus* des autres genres de coques à Gram positif. Notamment, cette distinction est importante entre les genres *Micrococcus*, *Kocuria* et *Staphylococcus*, du fait de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques proches, et des niches écologiques qu'ils ont en commun (CAMILLE, 2007).

1.3 Classification des staphylocoques et les différentes espèces du genre staphylococcus.

1.3.1 Les staphylocoques à coagulase positive (s.c.p).

Ils possèdent une enzyme, la coagulase qui permet de l'identifier, ce groupe se compose essentiellement des staphylocoques dorés, les staphylocoques à coagulase positif sont des bactéries formant des colonies caractéristiques ou non caractéristiques à la surface d'un milieu de la culture sélectif en donnant une réaction positive à la coagulase lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifié dans la norme **ISO 6888-1(annexe 03)** .

Le dénombrement des staphylocoques à coagulas positive dans les produits destinés à la consommation humaines ou l'alimentation animale, se fait par comptage des colonies obtenus sur un milieu solide (milieu de Baird-Parker) après incubation aérobie à 35°C ou 37°C.

L'expression staphylocoques à coagulase positive correspond à staphylococcus aureus principalement. Plusieurs espèces staphylococciques autres que staphylococcus aureus produisent des entérotoxine, sauf staphylococcus intermedius qui a été clairement impliquées dans une toxi-infection alimentaire staphylococcique.

On notera aussi que ; parmi les espèces coagulase négative, *staphylococcus cohnii*, *staphylococcus epidermidis*, *staphylococcus haemolyticus* et *staphylococcus xylosus*, ont été isolés du lait de brebis, et se sont avérés produire une ou de plusieurs entérotoxines staphylococciques (Christiane joffin et al, 2010).

1.3.1.1 Staphylococcus aureus :

Staphylococcus aureus est un germe appartenant au groupe des cocci à Gram positif qui pousse en amas. Cette bactéries non productrice de spores mais résistante, peut survivre

longtemps sur des objets inanimés et secs, elle résiste aussi relativement bien à la chaleur (de la Fuente et al, 1985).

a. Caractères bactériologiques :

Tableau 01. Différents caractères bactériologiques des *Staphylococcus aureus* (de la Fuente et al, 1985).

Morphologie	Regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers Immobile ; non sporulé
Dimension (µm)	0,5-1
Teneur en GC (mol%)	33%
Taille du génome (Mb)	2,8 - 2,9
Type respiratoire	Aéro anaérobie facultatif
Type trophique	chimioorganotrophe
Métabolisme	Fermentaire et /ou respiratoire
Autres caractères	Catalase positive – oxydase négative Halophile – mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH_{opt}=7 ; pH_m ; Aw : basse, jusqu'à 0,83

Tableau 02 : Caractères différentiels des principales espèces de Staphylocoques (HINANA et SLAMAT, 2005).

Caractère	<i>S.aureus</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Pigment	+	-	-
Coagulase	+	-	-
ADNase	+	-	-
Re.novobiocine	-	-	+
Nitrate réductase	+	+	-
Phosphatase	+	+	-
D.mannitol	+	-	- ou +
Clumping factor	+	-	-
Hémolysine	+	-	-
Protéine A	+	-	-



Photo 1 : Couques de *Staphylococcus aureus* disposée en grappes de raisins ; micrographie électronique à balayage (Gx100) (WILLEY et *al.*, 2010).

Tableau 03 : Classification phénotypique des espèces et sous-espèces du genre *Staphylococcus* (Stepan et al. 2004).

Espèces et sous-espèces à coagulase positive	Espèces et sous-espèces à coagulase négative		
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i> <i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> <i>S. delphini</i>	Novobiocine sensibles et à oxydase négative	Novobiocine résistantes et à oxydase négative	Novobiocine résistantes et à oxydase positive
<i>S. hyicus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. lutrae</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	<i>S. auricularis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>capitis</i> <i>S. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> <i>S. caprae</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>carnosus</i> <i>S. carnosus</i> subsp. <i>utilis</i> <i>S. chromogenes</i> <i>S. condimenti</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. felis</i> <i>S. haemolyticus</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. muscae</i> <i>S. pasteurii</i> <i>S. piscifermentans</i> <i>S. saccharolyticus</i> <i>S. schleiferi</i> subsp. <i>schleiferi</i> <i>S. simulans</i> <i>S. warneri</i>	<i>S. arlettae</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> <i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>equorum</i> <i>S. equorum</i> subsp. <i>linens</i> <i>S. gallinarum</i> <i>S. hominis</i> subsp. <i>novobiosepticus</i> <i>S. kloosii</i> <i>S. nepalensis</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>bovis</i> <i>S. saprophyticus</i> subsp. <i>saprophyticus</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>casei</i> <i>S. succinus</i> subsp. <i>succinus</i> <i>S. xylosus</i>	<i>S. fleurettii</i> <i>S. lentus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>carnaticus</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>rodentium</i> <i>S. sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> <i>S. vitulinus</i>

1-3-2 les staphylocoques à coagulase négative (s.c.n)

La majorité des staphylocoques à coagulase négative distingue plus de 30 espèces parmi lesquelles on peut citer *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* qui sont moins fréquents dans les infections. Les espèces les plus impliquées dans les infections sont :

- ✓ *Staphylococcus capitis*.
- ✓ *Staphylococcus cohnii*.
- ✓ *Staphylococcus haemolyticus*.
- ✓ *Staphylococcus hominis*.
- ✓ *Staphylococcus lugdunensis*.
- ✓ *Staphylococcus schleiferi* ssp *scheiferi*.
- ✓ *Staphylococcus warneri*.
- ✓ *Staphylococcus simulans*.

Les Staphylocoques coagulase négative (SNC) peuvent être divisés en six grands groupes. Cependant, les espèces rencontrées en pathologie humaine sont localisées dans deux groupes : le groupe de *Staphylococcus epidermidis* et le groupe de *Staphylococcus saprophyticus* Alain HERARD et al ; 1998),

Origine		Espèce	référence
Laits			
Lait de vache		<i>S. capitis</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. pasteurii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosum</i>	Rather <i>et al.</i> 1986; Ben Hassen <i>et al.</i> 2002; Bjorland <i>et al.</i> 2005
Lait de brebis		<i>S. auricularis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. chromogenes</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. hyicus</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. xylosum</i>	Ariznabarreta <i>et al.</i> 2002; Hariharan <i>et al.</i> 2004
Lait de chèvre		<i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. xylosum</i>	Deinhofer <i>et al.</i> 1995 ; Bjorland <i>et al.</i> 2005
Fromages au lait cru			
Pâte pressée non cuite	Cázar de Cáceres	<i>S. caseolyticus</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. xylosum</i>	Cáceres <i>et al.</i> 1997
	Morbier	<i>S. equorum</i> , <i>S. lentus</i>	Ogier <i>et al.</i> 2004
	Salers	<i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i>	Delbès <i>et al.</i> 2005
Pâte molle et croûte lavée	Différents fromages	<i>S. equorum</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. succinus</i> , <i>S. warneri</i>	Hoppe-Seyler <i>et al.</i> 2004
	Durrus	<i>S. epidermidis</i>	Mounier <i>et al.</i> 2005
Tous types		<i>S. capitis</i> , <i>S. cohnii</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. kloosii</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. xylosum</i>	Irlinger <i>et al.</i> 1997
Fromages pasteurisés			
Pâte persillée	Stilton	<i>S. equorum</i>	Ercolini <i>et al.</i> 2003
Pâte pressée non cuite	Ardrahan	<i>S. equorum</i>	Mounier <i>et al.</i> 2005
	Millens	<i>S. equorum</i>	Mounier <i>et al.</i> 2005
	Gubbeen	<i>S. saprophyticus</i>	Mounier <i>et al.</i> 2005

Tableau 04 : Espèces de staphylocoques à coagulase négative isolées des produits laitiers

2. Antibiogramme :

2.1. Bétalactamines

La pénicilline G est très active sur les souches de *S.aureus* non productrices de pénicillinase, mais ces souches sont rares aujourd'hui (< 10%). Les souches productrices d'une pénicillinase redeviennent sensibles à l'amoxicilline en présence d'acide clavulanique. Les pénicillines semisynthétiques du groupe M (méthicilline et oxacilline) ne sont pas détruites par la pénicillinase de *S.aureus*. Ce sont d'excellents antibiotiques anti-staphylococciques.

De 10 à 50 % des souches de *S.aureus* isolées dans les hôpitaux français résistent à la méthicilline et à l'oxacilline. Ces souches sont désignées comme *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méthicilline (SARM) (JEAN-LOUIS et JEAN-LOUP, 2002).

Cette résistance est aussi qualifiée d'« hétérogène ». En effet, pour certaines souches, seulement une partie de la population bactérienne est capable *in vitro*, d'exprimer sa résistance. Cette résistance est due à l'acquisition par la souche de staphylocoque d'un déterminant chromosomique, le gène *mec A*. Il s'ensuit la production d'une protéine liant la pénicilline (PLP) additionnelle.

Les travaux cliniques ont montré que toutes les pénicillines et toutes les céphalosporines sont inactives sur les souches résistantes à la méthicilline (JEAN-LOUIS et JEAN-LOUP, 2002)

Chapitre 02 : les staphylocoques dans l'industrie alimentaire

1. l'origine des staphylocoques dans les produits alimentaire

La toxi-infection alimentaire est une affaire très sérieuse qui tourmente les chercheurs alimentaire d'une coté et les contrôleurs de qualité de l'autre coté, il est a signalé qu'il ya plusieurs causes qui favorisent et promouvoir la toxi-infection, ces causes qui sont derrières la toxi-infection en général et les staphylocoques en particuliers sont appelés les cinq M qui sont : matière première, matériel, main d'œuvre, le milieu et la méthode.

1.1 Matière première : tous les aliments (sauf l'eau) proviennent des être vivants ou une partie d'être vivants, or les parties vivants en contact avec l'extérieur (peau, tube digestif) ne sont pas stérilisés ; les micro-organismes de ces zones se retrouves dans l'aliment.

1.2 Matériel : le matériel et les machines utilisés pour les transformations (couteau, broyeurs, plants) aussi que les eaux de lavage ne sont pas stérilisés, ils apportent donc des micro-organismes et cela d'autant plus qu'ils ne seront pas nettoyés et désinfectés correctement.

1.3 Main-d'œuvre : principalement les aliments, le personnel de préparation peut apporter de nombreuse micro-organismes par l'intermédiaire :

-  De la peau, des poils et cheveux.
-  De la bouche.
-  Des vêtements.

1.4 Milieu : il peut être aussi une source de contamination notamment :

-  Par l'air.
-  Par les insectes et acariens.
-  Par les rongeurs (souris et rats).

1.5 Méthode : certains aliments (yaourts, saucissons) sontensemencés par des 'ferments' le plus souvent des bactéries lactiques (Davide Lubin, 1995).

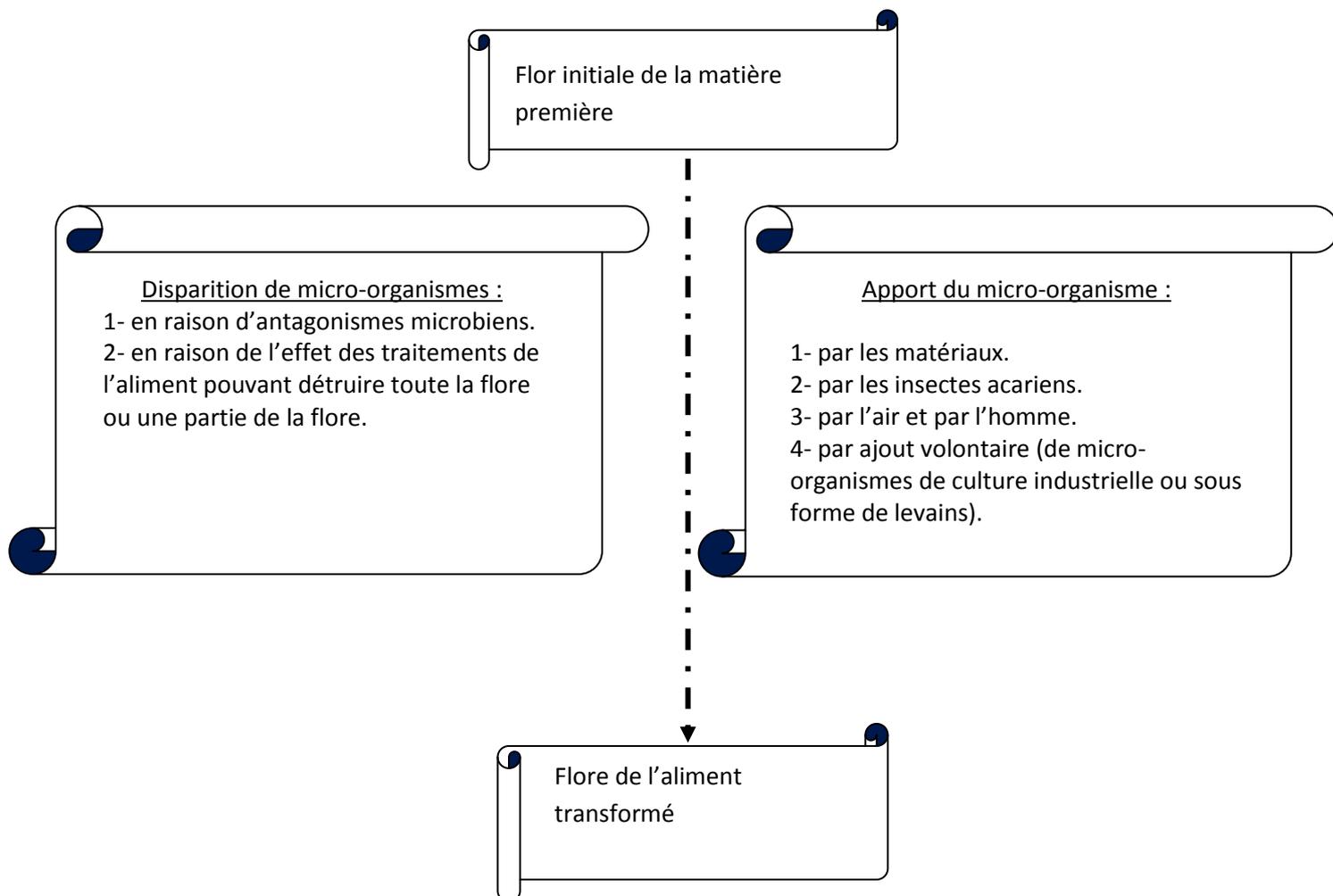


Figure N°01 : Schémas récapitulatif de l'origine des micro-organismes dans les aliments

2. Toxi-infections alimentaires (TIA) à S.aureus

Les TIA à S.aureus sont en réalité des intoxications dues à l'ingestion d'aliments dans lesquels une souche de S.aureus s'est multipliée et a produit une ou plusieurs entérotoxine.

2.1 Les symptômes :

Les symptômes les plus fréquemment observés lors de ces intoxications sont des Vomissements violent et répétés, des nausées, des diarrhées aqueuses et des douleurs abdominales. Occasionnellement peuvent être observés : maux de tête, transpiration, frissons, crampes musculaires, faiblesse générale, hypotension, et prostration. Les TIA à S .aureus étant dues à des toxines préformées dans l'aliment et non à une colonisation digestive par une

bactérie entéropathogène, il n'y a en général pas de fièvre ou une fièvre modérée (MICHEL, 2005).

Les symptômes surviennent après une période d'incubation courte, entre 2 et 4 heures en moyenne après la consommation du repas contaminé, et disparaissent spontanément après 18 à 24 heures. Les cas de décès à la suite de TIA à *S.aureus* sont très rares et surviennent chez les jeunes enfants et les personnes âgées à la suite d'une déshydratation brutale provoquée par les vomissements et les diarrhées (MICHEL, 2005).

Du point de vue clinique, les intoxications provoquées par *S.aureus* ressemblent au syndrome émétique dû à certaines souches de *Bacillus cereus* (incubation courte, prédominance des vomissements, durée des symptômes) (tableau IV).

Elles se différencient des pathologies digestives dues à *Clostridium perfringens* ou de syndrome diarrhéique dû à certaines autres souches de *Bacillus cereus*, qui présentent une incubation plus longue et se manifestent surtout par des diarrhées (MICHEL, 2005).

Tableau 05 : Comparaison des toxi-infections alimentaires dues à *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* et *Clostridium perfringens* (MICHEL, 2005).

Bactérie responsable	incubation	Durée des symptômes	Diarrhées douleurs abdominale	vomissements
<i>S.aureus</i>	01 à 06 h	06 à 24 h	Habituel	Prédominant
<i>B.cereus</i> (SE)	01 à 05 h	06 à 24 h	Habituel	Prédominant
<i>B.Cereus</i> (SD)	08 à 16 h	12 à 24 h	Prédominant	occasionnel
<i>C.perfringens</i>	08 à 22 h	12 à 24 h	Prédominant	rare

2.2 La prévention :

La prévention nécessite des mesures à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis la production jusqu'à la transformation, la fabrication et la préparation des aliments. Diverses précautions à prendre pour éviter toute contamination des aliments et donc assurer leur salubrité.

Réfrigération rapide des aliments ne pas rompre la chaîne du froid des aliments en particulier les surgelés qu'il faut acheter au dernier moment et déplacer au frais le plus rapidement possible.

- ✚ Cuisson des aliments à des températures adéquates.
- ✚ Respecter les règles élémentaires d'hygiène veillant à la propreté de la vaisselle et des mains.
- ✚ Jeter tous les conserves bombées et respecter les barèmes (température, et temps), de stérilisation des conserves ménagères.
- ✚ Conservation des aliments à l'écart les uns des autres pour éviter la contamination croisés et ainsi la prolifération des germes.

Les mesures de prévention TIA (toxi-infection alimentaire) dues au *S. aureus* ont pour but ; D'éviter ou limiter la contamination des aliments pas *S. aureus*. Et si *S. aureus* est présent, elle empêche sa multiplication dans l'aliment.

La prévention des TIA à *S. aureus* repose essentiellement sur des mesures d'hygiène de production et de conservation des aliments.

- ✚ Eviter la contamination des aliments par les porteurs des virus.
- ✚ Traiter les infections ORL et cutanées.
- ✚ Eviter la multiplication des germes en ne laissant pas séjourner les aliments entre 30°C et 65°C.
- ✚ Respecter les règles fondamentales de port des effets personnels comme la tenue,etc. (M .Ananya Mandal (2012).

Chapitre 03 : Matériel et méthode

Tableau 06 : présentation de matériel utilisé dans le laboratoire.

Appareils et autres	Verrerie	Milieux de culture		Réactifs et autres
		Liquide	solide	
<ul style="list-style-type: none"> - Etuve bactériologique ; - Bain marie ; - Réfrigérateur ; - Autoclave ; - Balance magnétique ; - Agitateur magnétique ; - Bec bunsen ; - Pince ; - Boites de pétri ; - Portoirs ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Flacons stériles de 1L, 2L ; - Tubes à essais ; - Tubes vacuteners ; - Pipettes pasteur ; - Pipette graduée ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Bouillon Coeur cervelle ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Gélose baird-parker - Gélose Chapman; - Gélose Muler Hinton ; - Gélose nutritive. - Gélose Columbia 	<ul style="list-style-type: none"> - Disque antibiotique - Plasma de lapin ; - Eau oxygénée ; - Eau physiologique ; - Eau distillée stérile ; - Violet de gentiane ; - Lugol ; - Alcool à 96°C ; - Fuschine ; - Eau de javel ; -cristal violet

I. Recherche et dénombrement des staphylocoques (Milieu du Chapman et Baird Parker) :

1. But :

La recherche et le dénombrement des staphylococcus aureus, les seules à produire éventuellement une entérotoxine protéique cause d'intoxication alimentaire permettant de savoir si l'aliment présente des risques pour le consommateur. L'interprétation des résultats doit se faire en tenant compte des critères.

2. Principe :

Le dénombrement des staphylococcus aureus est réalisé à des milieux sélectifs précis de produit ou de dilutions est étalé sur un milieu sélectif solide (Chapman ou surtout Baird-Parker). Les colonies suspectées observés sur ce milieu sont comptés et identifiés, si ce sont des staphylococcus aureus, on pourra ainsi préciser leurs nombres dans le volume initial. S'il n'ya pas de staphylococcus après isolement, ce peut être parce qu'ils étaient trop peu nombreux. On peut réaliser dans ce cas un enrichissement en milieu sélectif (bouillon de Chapman ou hyper salé) puis recommencer les opérations précédente à partir du ce bouillon, on indique ainsi le nombre minimale de staphylococcus aureus dans le volume initial de produit versé dans le bouillon.

3. Matériel :

- ✓ Milieu gélose de Baird-Parker (composé en annexe01) coulé en boite de pétri.
- ✓ Pipette graduées.
- ✓ Etaleur.
- ✓ Etuve, réglé à $37C^{\circ} + 01C^{\circ}$.
- ✓ Tubes stériles.
- ✓ Milieu de dilutions.

4. Mode opératoire :

Prendre une boite du milieu du Baird-Parker (méthode du routine), pour les méthode de référence réalisés, les opérations en double à l'aide d'une pipette stérile déposer 0.1ml soit de l'échantillons pour essai si liquide, soit de suspension –mère- répéter avec les dilutions suivantes en utilisant une nouvelle pipette stérile à chaque dilution.

Etaler le plus rapidement possible avec l'étaleur, l'échantillon ou les dilutions déposées à la surface du milieu de culture, ne pas toucher les parois de boîte avec l'étaleur, utiliser un étaleur stérile pour chaque boîte.

Laisser les boîtes sur la paillasse, couvercle ferme pendant environ 15 min afin que l'excès d'humidité disparaisse.

Mettre les boîtes en incubation à 37°C pendant 24h±2h.

Milieu du Chapman :

La méthode utilisé pour ce milieu est la même que le milieu du Baird-Parker.

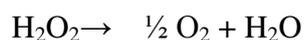
II. La catalase :

1. But

La recherche de la catalase présente un intérêt taxonomique en ce qui concerne les bactéries à Gram +.

2. Principe

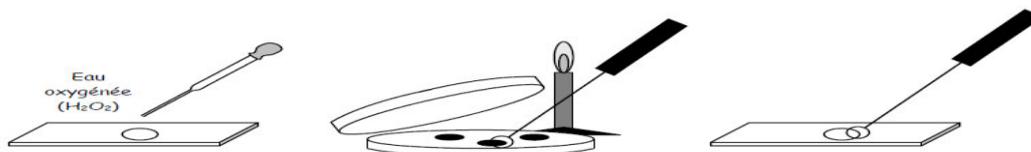
La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) :
Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.



Produit toxique formation de bulles pour les bactéries

3. Technique :

- ⊗ Déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) à l'aide d'une pipette Pasteur.
- ⊗ Prélever une colonie à l'aide de l'anse.
- ⊗ Dissocier la colonie dans la goutte.



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite : Catalase +	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite : Catalase.

III. Coloration du gram :

1. But :

Il permet l'étude microscopique des bactéries mortes après fixation et coloration. La coloration de GRAM permet de différencier des bactéries dites **Gram +** de bactéries dites Gram -.

Matériel nécessaire :

- ⊗ une lame.
- ⊗ du Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche).
- ⊗ du lugol.
- ⊗ de l'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué.
- ⊗ de la Fuschine fraîchement préparée.
- ⊗ de l'eau dé minéralisée.
- ⊗ microscope photonique : objectif x 40 et x100.
- ⊗ du papier filtre.

2. Technique :

Tableau 07 : les étapes de coloration du gram.

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
COLORATION PRIMAIRE	<ul style="list-style-type: none"> Ⓢ Recouvrir la lame de cristal violet ou violet de gentiane. Ⓢ Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal (annex01)violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration). 	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
MORDANÇAGE	<ul style="list-style-type: none"> Ⓢ Recouvrir de Lugol(annex02). Ⓢ Rincer à l'eau distillée et l'égoutter 	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.
DECOLORATION	<ul style="list-style-type: none"> Ⓢ Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore. Ⓢ Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter 	5 secondes environ	<p>L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores.</p> <p>Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool (épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.</p>
COLORATION SECONDAIRE	<ul style="list-style-type: none"> Ⓢ Recouvrir la lame de fuschine(annex01). Ⓢ Rincer à l'eau distillée. 	1 minute	La fuschine recolore en rose les bactéries précédemment décolorées : les bactéries Gram – ou négatif.
SECHAGE	<ul style="list-style-type: none"> Ⓢ - Egoutter entre 2 morceaux de papier-filtre et laisser sécher 		

3. Mise au point :

- Ⓢ Repérer les bactéries à l'objectif x40.
- Ⓢ Déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis.
- Ⓢ Faire la mise au point en forte luminosité (condensateur levé et diaphragme ouvert) objectif x100.
- Ⓢ Se placer dans un endroit où la répartition des bactéries est homogène et la coloration nette.
- Ⓢ Eliminer les lames dans le bocal déchets non infectieux

4. Observations :

On peut noter la morphologie des bactéries et la coloration de celles-ci : les bactéries violettes sont dites Gram positives, celles qui sont roses sont dites Gram négatives. On peut également noter l'homogénéité de coloration de la bactérie.

IV. Recherche de la staphylo-coagulas libre :

1. Principe :

Les staphylocoques pathogènes sécrètent une enzyme la staphylocoagulase qui a la propriété de coaguler le plasma de lapin, et qui est utilisée pour distinguer les staphylococcus aureus des autres staphylocoques.

2. Matériel :

- ⊗ tubes à hémolyse stériles.
- ⊗ Plasma de lapin.
- ⊗ Pipettes graduées stériles.
- ⊗ Etuve à 37°C.
- ⊗ Bouillon – Cœur – cervelle stérile.(annex01)

3. Mode opératoire :

Elle se fait en tube en mettant en présence 0.5ml d'une culture en bouillon cœur-cervelle de 18 heures à 35°C et 0.5 de plasma de lapin lyophilisé reconstitué.

4. Lecture :

La coagulation de plasma est observée généralement dans 03 à 04 heures.

V. La biotypage

1. Recherche de l'hémolysine β :

Principe :

La bêta-hémolysine est une exotoxine de 33 Kda comme une sphingomgélinas de type C (Huseby et al, 2007) qui dégrade la sphingomyéline contenue dans la couche phospholipidique extérieure de membrane des érythrocytes, cette dégradation n'aboutit pas à la lyse des cellules, mais les rend faciles à détruire par autre agents lytiques (Nulsson et al, 1999). On ne connaît pas réellement son rôle dans les pathogènes humains où réellement détruit

sélectivement les monocytes et aucun autre type cellulaire. (Waleviet et al, 1996). 2.

Matériel :

- ☉ Gélose Columbia (annexe composition01).
- ☉ Sang de mouton défibriné stérile.

Méthode :

La recherche de l'hémolysine B est faite sur boîte de gélose Columbia additionné de 05% de sang de mouton défibriné stérile.

Les souches sont inoculées en stries et piqures, l'activité hémolytique se traduit par une zone d'hémolyse incomplète à bord net après incubation de 24 heures à 27°C. Elle devient complète après une nuit à 04°C, elle est du type « chaud, froid ».

2. Staphylokinase :

Principe :

La Staphylokinase (SAK) est une glycoprotéine de 136 acides aminés sécrétée par certaines souches de staphylocoques aureus (Aless, 2000).

SAK facilite l'activation des plasminogène, les précurseurs de la protéase fibrinolytique plasmine (Jintao et al). Elle forme un complexe avec le plasminogène qui est convertit ainsi en plasmine, active d'autres molécules de plasminogène dans le plasma, cette enzyme peut dissoudre des amas de fibrine sans pour autant y associer une dégradation du fibrinogène (Deverriere, 2007).

Cette substance thermolabile est antigénique, un rôle dans la formation d'embolie septique (Avrilet et al, 1992).

Matériel :

- ☉ Gélose nutritive (composition annexe01).
- ☉ Plasma du lapin.

Méthode :

Cette enzyme est recherchée sur boîte de gélose nutritive additionnée de 20% du plasma de lapin chauffé à 56°C pendant 15min. cette gélose est inoculé par piqure avec la souche à tester

et incuber pendant 24 heures à 37°C, l'activité se révèle par l'apparition d'une zone de lyse à bords nets autour du puits d'inoculation.

3. Coagulation du plasma bovin :

Matériel :

- ② Milieu bouillon –cœur-cervelle.
- ② Plasma de bovin.

Méthode :

Sur le test de la coagulation de plasma bovin est effectué en ajoutant dans un tube hémolyse 0.1 ml d'une culture staphylococcique incubée à 18 heures à 37°C en bouillon –cœur-cervelle, avec 0.5 ml de plasma bovin est considéré comme positive lorsque les trois – quarts du volume initiale sont pris en masse après 06 heures d'incubation à 37°C.

4. Test sur un milieu au cristal violet :

Matériel :

- ② Milieu nutritif.
- ② Cristal violet.
- ② Gélose cœur cervelle.

Mode opératoire :

Ce test est effectué sur un milieu nutritif additionné de 08 à 10 mg/ml de cristal violet, les souches à tester sont obtenus sur gélose cœur cervelle sont déposés en amas de 02 à 03 mm du diamètre sur la gélose, les boîtes sont incubés à 37°C, la coloration des colories est observée après 48 heures.

On doit considérer l'existence de trois types différents :

- ② Type A : coloration jaune pâle ou vif quelque fois à bords violet.
- ② Type C : coloration bleuté ou violet.
- ② Type E : coloration blanche.

L'antibiogramme est une technique de laboratoire.

VI. L'antibiogramme :

Elle permet de déterminer la sensibilité d'un germe aux différents antibiotiques testés.

Matériel :

- ⊗ Une gélose *Muler-Hinton*(annex01) en boîte pétri.
- ⊗ Disques d'antibiotique ou un distributeur permettant le dépôt standardisé des disques sur la gélose.
- ⊗ Une souche pure de la bactérie à étudier.
- ⊗ Un râteau ou un écouvillon.
- ⊗ Une pipette pasteur.

Mode opératoire :

En pratique on réalise à partir de l'isolement (souche pure), un ensemencement en tapis sur le milieu (*Muler-Hinton*), on dispose ensuite les disques d'antibiotiques et on place à l'incubateur au bout de 24 heures et 37°C on lit les différents diamètres d'inhibition et on peut conclure en comparant ceux-ci aux abaques de lecture.

Chapitre 04 : Résultats et discussions

Tableau 08: les échantillons analysés :

Les produits laitiers	Echantillons	Dénombrement direct sur Baird-Parker (ufc / ml).	JORA(1998)
Fromage fondu	3	Absence	1
L'ben industriel	5	Absence	1
Petit suisse	2	Absence	1
Lait de sachet	5	Absence	1
Lait de vache industriel	5	Absence	1
Lait de vache cru (mélange) :	4	Staphylocoques aureus	
1. Tizi-Ouzou	1	79 *10³	Absence
2. Boudouaou	1	57 *10³	Absence
3. O- hadaj	1	61 *10³	Absence
4. Zemouri	1	00	Absence

Interprétation :

Les résultats relatifs aux dénombrements des staphylocoques présumés pathogènes dans les produits laitiers stériles (fromage fondu, les petits suisses, L'ben industriel, lait de vache industriel et lait de sachet) ont montrés l'absence des ces germes. Ceci prouve l'efficacité du traitement thermique par contre le lait de vache cru a montré une présence des staphylocoques pathogènes.

Discussion : nos résultats sont conforme aux normes ; établis par journal officiel de la république algérienne 1998 qui stipule l'absence de staphylocoque pathogène dans 25ml de lait, pour le lait de vache cru nous avons notés la présence de staphylococcus présumé pathogène dans les région de(Tizi-Ouzou, Boudouaou ,O- hadaj) seul le lait de Zemouri est conforme aux norme établies par le jora 1998 Ces derniers sont identique a ceux trouvés par chermitti Khadija(2017)et pour m . boukhemia Sada(1984) confirmé l'absence des s .aureus dans l'échantillon de lait cru testé.

Tableau 09 : Dénombrement sur le milieu Chapman (après enrichissement dans le milieu liquide giolitticantoni) :

Lait de vache cru	Par code de région	Par couleur du milieu après incubation	Dénombrement des S. aureus	Mannitol	Catalase	Coloration de gram
Tizi-Ouzou	T ₁	Jaune doré	178 *10³	+	+	Violet
	T ₂	Jaune doré	157 *10³	+	+	Violet
Ouled Hadaj	O ₁	Jaune doré	148 *10³	+	+	Violet
	O ₂	Jaune doré	161 *10³	+	+	Violet
Boudouaou	B ₁	Rouge	00	-	+	Rose
	B ₂	jaune doré et rouge	00	-	+	Rose
	B ₃	jaune doré rouge	00	-	+	Rose
	B ₄	Jaune doré	00	-	+	Rose
	B ₅	Jaune doré	167 *10³	+	+	Violet
	B ₆	Rouge	00	-	+	Violet
	B ₇	Jaune doré	159 *10³	+	+	Violet

Interprétation :

Les résultats s'expriment ici en présence ou absence dans une certaine quantité des souches bactérienne (25 g).

Figure 0 3: observation macroscopique des staphylocoques.

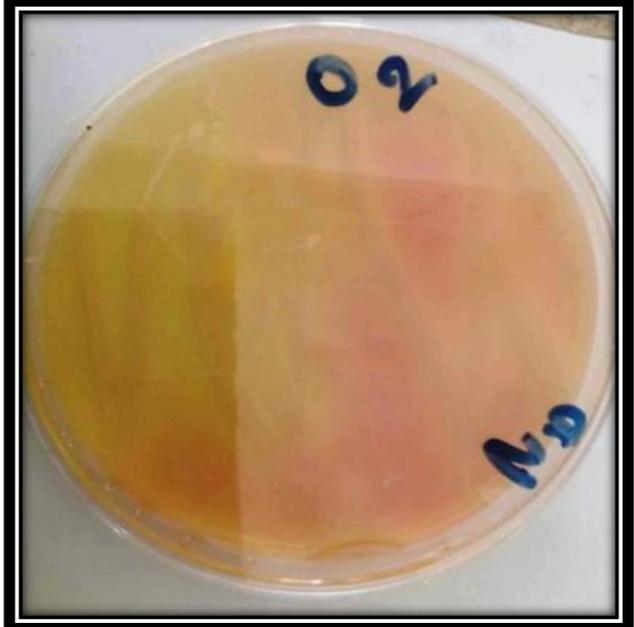
<p>Milieu du Baird- Parker</p>		<p>Interprétation</p> <p>Les colonies noires qui sont entourés par des halos transparents sont présumées être des staphylocoques aureus, mais les autres colonies noires qui restent sont des staphylocoques non aureus.</p>
<p>Milieu du Chapman</p>		<p>Interprétation</p> <p>Le milieu devient jaune donc les colonies sont mannitol positif.</p> <p>L'autre milieu qui est resté rouge : les colonies sont mannitol négative.</p>

Tableau 10: Identification des résultats des staphylocoques.

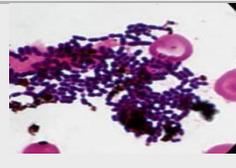
caractère	Catalase	Coloration de gram	Coagulase (+)	Coagulase (-)
				
interprétation	Il ya des bulles : donc présence de catalase.	Coloration bleu violet: gram positive.	Coagulation positive: donc présence des staphylocoques aureus.	Coagulation négative : donc absence des staphylocoques aureus.

Tableau 11: les résultats du test coagulase.

N° Région	T ₁	T ₂	O ₁	O ₂	B ₅	B ₇
Test coagulase	+	-	-	+	-	+
Résultats	S.a	S.n.a	S.n.a	S.a	S.n.a	S.a

S.n.a : staphylocoques non aureus.

S.a : staphylocoques aureus.

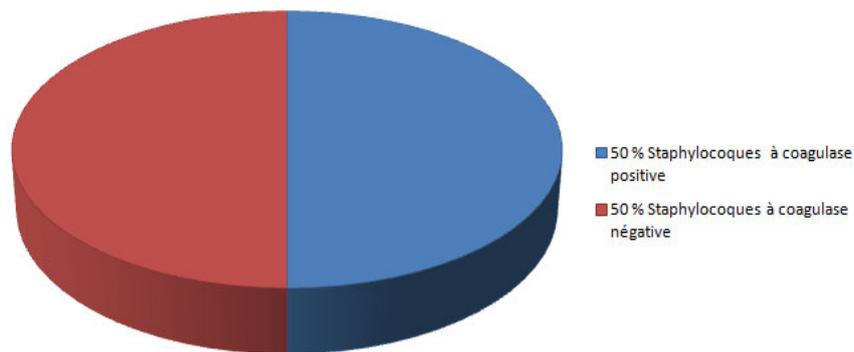


Figure 03 : la fréquence des déférentes catégories des Staphylocoques .dans le lait de Vache crue

Interprétations :

Les trois souches des staphylocoques (T₁, O₂ et B₇) sont coagulase positive (SCP) et elles sont confirmées pathogènes. Et les autres issues des échantillons (T₂, O₁ et B₅) ne possèdent pas une coagulase positive, cependant elles peuvent être pathogènes si elles possèdent une ADNase et Phosphatase.

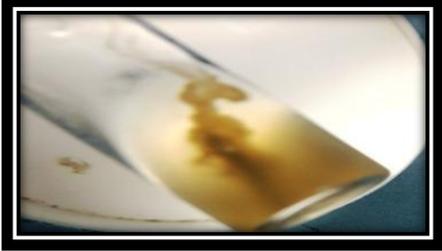
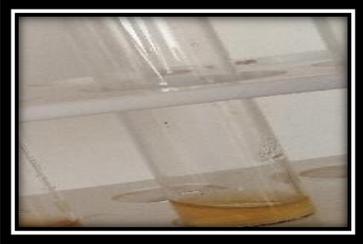
NB : les tests n'ont pas été réalisés, faute de produit.

Discussion :

Selon (Pierre Charbonneau, 2013), sur les souches étudiées, il a trouvé (57.17%) staphylocoques coagulase positif et (42.83%) staphylocoques à coagulase négatif et pour madame Boukhemia Sada (1984), coagulase positive 57.1, et coagulase 42.1

Ce qui concerne notre cas, les résultats trouvés sont très proche aux littératures et madame Boukhemia Sada : sur les souches étudiées, on a trouvé 50% des staphylocoques à coagulase positif et 50% des staphylocoques à coagulase négatif.

Les résultats relatifs au biotypage sont présentés dans la figure N°05 et illustrés par les photos a, b, c et d.

Photo de Test hémolysine (photo a).	Interprétation
	<p>Les colonies incomplètes à bord flou sont hémolysine B positive.</p> <p>Mais les colonies que ne changent pas sont β négative.</p>
Test Staphylokinase (photo b).	Interprétation
	<p>Staphylokinase positive : zone de lyse à bord nets autour du puits d'inoculation.</p> <p>Staphylokinase négative : pas de changement.</p>
Coagulation de plasma bovin (photo c).	interprétation
	<p>Coagulation négative : pas de coagulation</p>
Test cristal violet. (photo d).	Interprétation
	<p>(A) : les résultats jaune pale ou vif quelquefois à bord violet.</p>

Les résultats de biotypage sont résumés dans le tableau N° 12

N ₁	T ₁	T ₂	O ₁	O ₂	B ₅	B ₇
Test Staphylokinase.	+	+	-	-	+	-
Test hémolysine β	+	-	-	-	-	-
Test plasma bovin	-	-	-	-	-	-
Type cristal violet.	A	A	A	A	A	A
Biotype	Humain β+	Humain	HNS	HNS	Humain	HNS

Interprétation :

A partir de tableau mentionné dans (l'annexe 03), on a trouvé que l'origine des staphylocoques est un humain β positif, humain et hôte non spécifique(HNS).

Discussion :

A partir des souches étudié par Michel en 1998, 75% à 100% des souches été d'origine animale et 10% à 50% L'origine été humain, par contre dans notre étude presque la moitié des souches été d'origine humain, le reste été d'un hôte non spécifique ,mais Mme boukhemia Sada(1984) était la cause de contamination humaine exactement comme nous l'avons trouvée

Antibiogramme :

Les résultats relatifs à l'antibiogramme sont illustrés par la figure 06.



Photo -a-



Photo -b-

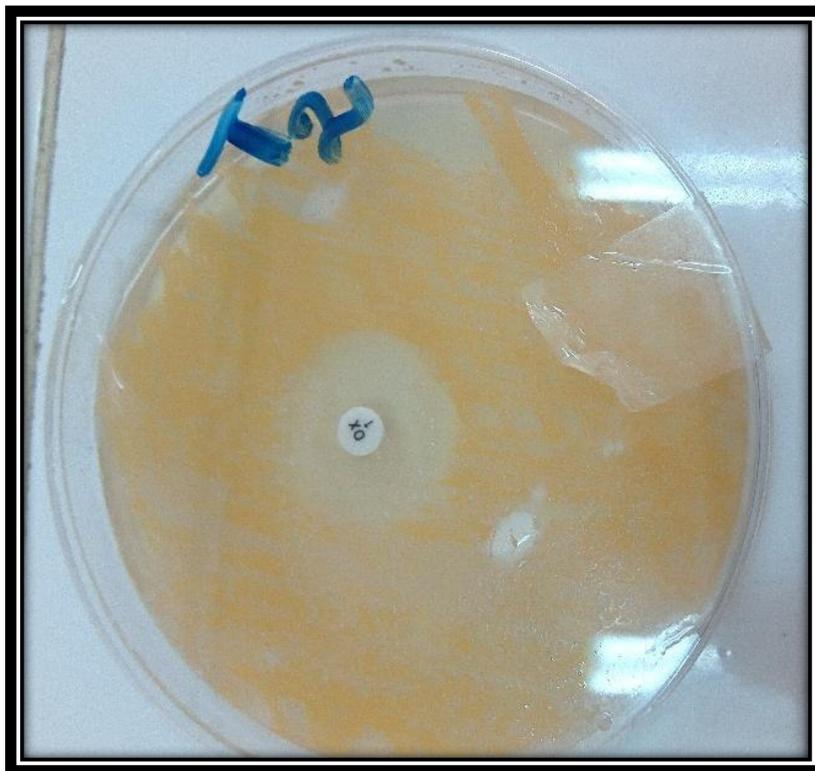


Figure -c-

Interprétation :

En se basant sur L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne qu'est donnée par **Mutai et al (2009)**, ils ont classés les diamètres des zones d'inhibitions (D) de la croissance microbienne en cinq classes :

- ☉ Très fortement sensible : si le diamètre de la zone d'inhibition ≥ 30 mm.
- ☉ fortement sensible : si le diamètre de la zone d'inhibition entre 21mm et 29mm.
- ☉ Modérément sensible : si le diamètre entre 16mm et 20 mm.
- ☉ Légèrement sensible : si le diamètre de la zone d'inhibition est entre 11 mm et 16mm.
- ☉ Non sensible : si le diamètre est inférieur à 10 mm.

Tableau 13 : la croissance microbienne en fonction de diamètre de la zone d'inhibition.

N° de région	T ₁	T ₂	O ₁	O ₂	B ₅	B ₇
Diamètre de zone d'inhibition	25mm	35mm	absence	absence	12mm	11mm
Résultats	Fortement sensible	Très fortement sensible	Non sensible	Non sensible	légèrement sensible	Légèrement sensible

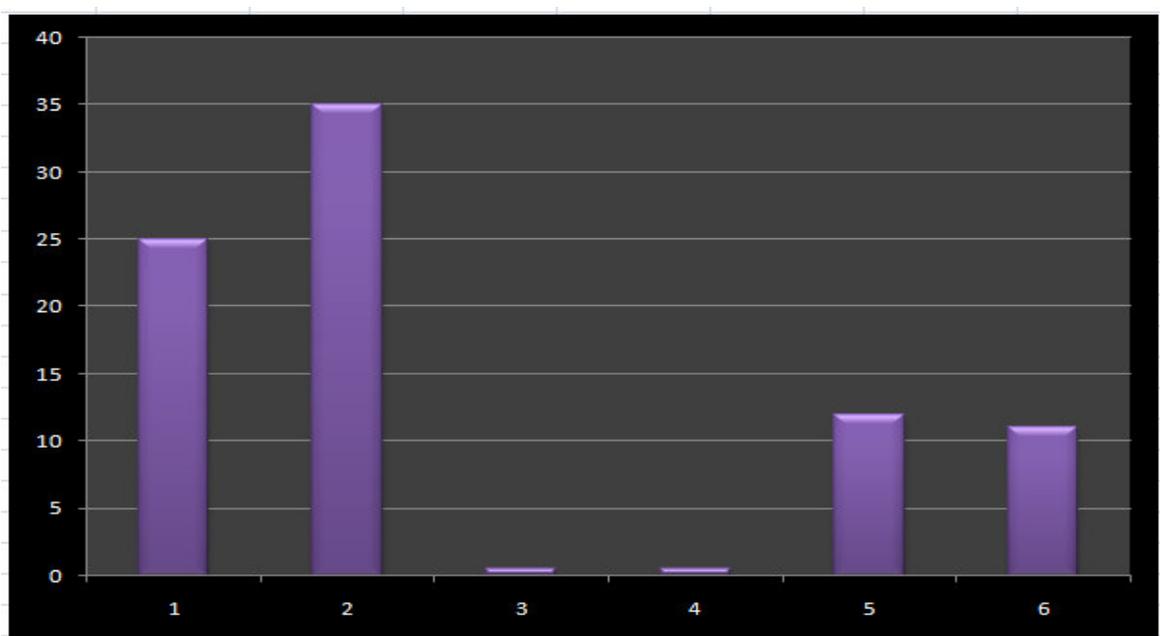


Figure 07 : histogramme de la sensibilité des souches.

Interprétation :

Les résultats de l'antibiogramme sont donnés dans le tableau 13 et illustrés dans les histogrammes figure 06, nous notons une résistance à l'oxacilline des souches (O₁ et O₂) et une légère sensibilité chez les souches (B₅ et B₇) par contre les souches (T₁ et T₂) sont fortement sensibles.

Discussion :

Les résultats de ces antibiogrammes sont très proche avec la littérature qui décrit que :

La pénicilline est bonne mais limité par le problème de résistance et que 50% des souches isolées sont non sensibles (Bouchot et al, 1985).

D'autres auteurs rapportent que la pénicilline constitue la principale anti-bio-résistance en pathologie mammaire (Seriey, 2006) et que l'action in vitro de l'oxacilline est excellente (Bouchot et al, 1985).

L'ampicilline sur 82 souches isolées : 55 % sont sensibles, 20% sont l'égerment sensible et 25 % sont résistantes (Bouchot et al, 1985).

Nekkache(1970) trouva : 70%de souches résistantes à l'ampicilline. .

33%de souches résistantes à l'oxacilline.

Pour madame Boukhemia Sada (1984) trouva : 46 ,4 %de souche sensible à l'oxacilline.

28 ,6% de souche intermédiaire à l'oxacilline.

25% de souche résistantes sensible

Concernant les résultats que nous avons trouvés, on peut conclure que nos résultats sont très proches pour les souches légèrement sensibles et résistants, par contre pour les souches sensibles, nos résultats sont un peu loin de la littérature étant donné le nombre limité des souches qu'ont été prise dans cette étude, nos résultats concordent avec ceux de Nekkache (1970) pour la résistance de l'oxacilline mais madame Boukhemia Sada (1984) son résultats très proche pour la résistante de l'oxacilline

Conclusion et recommandations :

Les aliments en générale sont des substances sensibles à la contamination microbienne, parmi les bactéries staphylococcus aureus, ce germe à la capacité de sécréter des enzymes et des toxines dans les produits alimentaires.

Le lait en général et le lait de vache en particulier est un aliment périssable et qu'est exposé facilement à la contamination.

Nos résultats montrent que les staphylocoques pathogènes dans les produits laitiers se trouvent seulement dans lait de vache crue, les autres produits par contre sont exempte de staphylocoques.

Après dénombrement, il s'est avéré que le nombre des staphylocoques aureus été considérable, afin de confirmer cette véracité on a pris des échantillons pour faire le test coagulase et il s'est avéré que la moitié de ces staphylocoques trouvées sont pathogènes confirmés.

Suite à ça, on s'est demandé d'où sont venus ces staphylocoques, et pour cela on a fait des tests de biotypage qui sont: hémolysine β , Staphylokinase, test plasma de bovin et cristal violet. L'origine de ces staphylocoques est humain, humain β positive et d'un hôte non spécifique.

Concernant l'antibiogramme et en utilisant l'antibiotique oxacilline, il y'avait des souches très fortement sensibles, des souches fortement sensible, des souches légèrement sensible et des souches résistantes. Le problème réside dans les souches résistantes et légèrement sensible qui prouvent qu'il ya acquisition d'une anti-bio résistance

Etant donné les répercutions négatives sur la santé du consommateur, il est d'une importance vital de proposer quelques recommandations afin d'éviter et éradiquer ce type de microbe :

- ✓ Le lait de vache doit être stérilisé avant la consommation.
- ✓ Les tétines des vaches doivent être proprement nettoyées avant la traite.
- ✓ Les machines à traire doivent être nettoyé après chaque utilisation.
- ✓ Les troupeaux doivent séjournés dans des lieux propres.
- ✓ Les aliments doivent répondre aux normes d'hygiène.
- ✓ Les vaches doivent être périodiquement suivi et contrôlés par un vétérinaire.

Les références

Alain HERARD (1), Lucien BRASME (2), Roland JAUSSAUD (3), Jérôme COLIN (1), Véronique VERNET-GARNIER (2), Bertrand LARDENNOIS (1998) Place actuelle des staphylocoques à coagulase négative en urologie.

Alessi M-C. (2000).Quels nouveaux fibrinolytiques Sang Thrombose Vaisseaux, Vol. 12, No. 6,371-8.

Amel Mamache (2009). Agroskopie (notion de toxicologie).

Ananya Mandal (2012).NEWS médical ,(prévention des staphylocoque doré).

Ariznabarreta, A., Gonzalo, C. & San Primitivo, F. (2002). Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to Staphylococci. *J. Dairy Sci.* 85, 1370-1375.

Avril J. L, Dabemat H, Denis F et Monteil H. (1992). Bactériologie clinique. 2ème édition. Paris : Ellipses Marketing, p 14, 16, 17.

Ben Hassen, S., Messadi, L. & Ben Hassen, A. (2002). Identification et caractérisation des espèces de *Staphylococcus* isolées de lait de vaches atteintes ou non de mammite

Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M. & Heir, E. (2005).Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *J Clin Microbiol.* 43, 4363-4368.

BOUCHOT M.C, CATEL J., CHIROL., GANIÈRE J.P, et LE MENEZ M (1985), *L'antibiogramme des infections mammaires des bovins. Recueil de médecine vétérinaire. Pp 587-601.*

Boukhemia Sada(1984), thèse, Dénombrement et caractérisation des staphylocoques pathogène présents dans quelque aliments.

Brun Y. et Bes M. (2000) Méthodes diagnostiques des Staphylocoques coagulase négatifs *Med. Mal. Inf., hors série Mars : 1*

CAMILLE D. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire. Ed. Tec et doc. Paris. P 357-361.

CRÉMOUX R., BARRAL J., BEUVIER E., CALLON C., GILBERT F., MONTEL M. C. et RAYNAL-LJUTOVAC K., (2008). Caractérisation et entérotoxigénicité des souches de *S.aureus* en filière caprine, identification des risques de contamination et étude d'outils de contrôle en vue de leur maîtrise, de la production à la transformation - Rapport final. Institut de l'élevage, 237 p.

Cáceres, P., Castillo, D. & Pizarro, M. (1997). Secondary flora of Casar de Cáceres cheese: Characterization of *Micrococcaceae*. *Int Dairy J.* 7, 531-536.

Chermitti Khadija (2017) ;thèse identification biochimique, microbiologique du lait vache destiné à la fabrication du fromage à pâte molle .

Christiane. Joffin, Jean Noel joffin (2010) : Microbiologie alimentaire (technique).

DAVIDE LUBIN. (1995). *Le lait et produit laitier dans la nutrition humaine* FAO. Rom (Italie).

Delbes, C. & Montel, M.C. (2005). Design and application of a *Staphylococcus* specific single strand conformation polymorphism-PCR analysis to monitor *Staphylococcus* populations diversity and dynamics during production of raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol.* 41, 169-174.

Deinhofer, M. & Pernthaner, A. (1995). *Staphylococcus* spp. as mastitis-related pathogens in goat milk. *Vet Microbiol.* 43, 161-166.

Deverriere B. V. M. (2007).Reproduction expérimentale de mammites a *Staphylococcus aureus* chez la brebis : Comparaison de lignées génétiques divergentes pour les comptages cellulaires. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. Toulouse: Université Paul-Sabatier.

Ercolini, D., Hill, P.J. & Dodd, C.E.R. (2003). Bacterial Community Structure and Location in Stilton Cheese. *Appl Environ Microbiol.* 69, 3540-3548.

Euzeby, J.P. (1997). List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol.* 47, 590-592.

Fuente, R, Suarez, G, Schleifer, K.H., 1985. *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* subsp.nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 99-102.

Hariharan, H., Donachie, W., Macaldowie, C. & Keefe, G. (2004). Bacteriology and somatic cell counts in milk samples from ewes on a scottish farm. *Can J Vet Res.* 68,188-192.

Hoppe-Seyler, T.S., Jaeger, B., Bockelmann, W., Noordman, W.H., Geis, A. & Heller, K.J. (2004). Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Syst Appl Microbiol.* 27, 211-218.

Huseby M, Ke Shi, Brown C. K, Digre J, Mengistu F, Seo K S et al. (2007). Structure and Biological Activities of Beta Toxin from *Stapilylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, Vol.189, No. 23, p. 8719-8726.

Irlinger, F., Morvan, A., El Solh, N. & Bergere, J.L. (1997). Taxonomic characterization of coagulase-negative staphylococci in ripening flora from traditional French cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 20, 319-328.

JEAN-LOUIS F. et JEAN-LOUP A. (2002). *Bactériologie générale et médicale*. Ed. Ellipses Edition Marketing. Paris. P 214-216-217.

Joseph pierre, G (2004). *Les pratiques des normes en microbiologie alimentaire*.

Journal officiel (1998) .

Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. (1986). Genus IV. *Staphylococcus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Williams & Wilkins. pp.1013-1035.

Loir, Y.L. and M. Gautier. 2010. *Staphylococcus aureus*. *Monographies de microbiologie*.

Ludwig, W., Schleifer, K.H., Fox, G.E., Seewaldt, E. & Stackebrandt, E. (1981). A phylogenetic analysis of staphylococci, *Peptococcus saccharolyticus* and *Micrococcus mucilaginosus*. *J Gen Microbiol.* 125, 357-366.

Michael M. et John M. et Thomas B. (2007). *Biologie des microorganismes*. 11^{ème} Ed. Peon France. Paris. P 379.

Michel, F. Laurent, S. Jean, L. (2005) : *Manuel de bactériologie alimentaire*.

Mourner, J., Gelsomino, R., Goerges, S., Vancanneyt, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Scherer, S., Swings, J., Fitzgerald, G.F. & Cogan, T.M. (2005). Surface microflora of four smear-ripened cheeses. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6489-6500.

MEYRAND A., BOUTRAND-LOEI S., RAY-GUENIOT S., MAZUY C., GASPARD C., JAUBERT G., PERRIN G., LAPEYRE C. et VERNZOZY-ROZAND C.(1998). « Growth and entérotoxine production of staphylococcus aureus during the manufacture and ripening of camembert-type cheeses from raw goats' milk ». *J. Appl. Microbiol.*, vol. 85(3), p. 537-544.

NEKKACH MOURAD ,(1970) sensibilité aux antibiotiques de 185 souches de staphylocoque pathogène isolées en 1970 au C.H.U d'Oran .

Mutai et al. (2009), Bechar Ghania, Belkacem Messaouda (2014). Etude par hydrodistillation et l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydant des huiles essentielles de l'origan vulgaire (*origanum, vulgare*) et menthe pouliot (*mentha pulegium*) **Nilsson I-M,**

Hartford O, Foster T, and Tarkowski A. (1999). Alpha-Toxin and Gamma-Toxin Jointly Promote *Staphylococcus aureus* Virulence in Murine Septic Arthritis. *Infection and immunity*, Vol. 67, No. 3, p. 1045-1049..

HINANA S. et SLAMAT K. (2005). Isolement et identification du *S.aureus* des prélèvements génitaux chez la femme. Mémoire de fin d'études supérieures de microbiologie. Université Kasdi Merbah Ouargla. P 12-13.

Ogier, J.C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J.Y. & Delacroix-Buchet, A. (2004). Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 70, 5628-5643.

Probst, A., Hertel, C., Richter, L., Wassill, L., Ludwig, W. & Hammes, W. (1998). *Staphylococcus condimenti* sp. Nov., from soy sauce mash, and *Staphylococcus carnosus* (Schleifer and Fischer 1982) subsp. *utilis* subsp. Nov. *Int J Syst Bacteriol.* 48.

PIERRE CHARBONNEAU et MICHEL WOLF (2013). *Infection en réanimation.*

Rosenbach, F.J., 1884. Microorganism bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen. Bergmann, J.F. Wiesbaden, 1-122.

Rather, P.N., Davis, A.P. & Wilkinson, B.J. (1986). Slime production by bovine milk *Staphylococcus aureus* and identification of coagulase negative staphylococcal isolates.

Schleifer, K.H. & Fischer, U. (1986). Description of a new species of the genus *Staphylococcus*: *Staphylococcus carnosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32, 153-156.

SERIEYS F. (2006), *anti-bio-résistance acquise des infections mammaires. Dossier spécial : bactériologie et lutte contre les mammites bovines. Bulletin des GTV, N° 33, 40-42.*

Stepan, J., Pantucek, R., Doskar, J., 2004. Molecular diagnostics of clinically important staphylococci. *Folia Microbiol.*, 49, 4, 353-386.

Walev I, Welier U, Strauch S, Foster T, Bhakdi S. (1996). Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*; 64(8): 2974-2979.

WILLEY J. M. et SHERWOOD L. M. et WOOLVERTON C. J. (2010). Microbiologie. 3^{ème} édit. de Boeck université. Bruxelles. P 582.

ANNEX 01 : Les géloses

1. Gélose Baird- Parker :

- ✓ Peptone ----- 10.0 g.
- ✓ Extrait de levure ----- 1.0 g.
- ✓ Extrait de viande ----- 5.0 g.
- ✓ Chlorure de lithium----- 5.0 g.
- ✓ Agar-agar bactériologique----- 12g à 22 g.
- ✓ Eau ----- 900 ml.

2. Gélose nutritive :

- ✓ Extrait de viande ----- 5.0 g.
- ✓ Peptone ----- 10.0 g.
- ✓ Chlorure de sodium----- 5.0 g.
- ✓ Agar----- 15 g.

3. Gélose de Chapman :

- ✓ Peptone ----- 10.0 g.
- ✓ Extrait de viande ----- 1.0 g.
- ✓ Chlorure de sodium----- 75.0 g.
- ✓ Mannitol ----- 10 g.
- ✓ Rouge phénol ----- 0.025g.
- ✓ Agar----- 15 g.
- ✓ Eau ----- 01 l.

Gélose Columbia :

- ✓ tryptone ----- 5.0 g.
- ✓ peptone pepsique ----- 5.0 g.
- ✓ hydrolysate de peptone animale et végétale ---- 10 g.
- ✓ Peptone trypsique de cœur ----- 03g.
- ✓ Amidon ----- 05 g.
- ✓ Chlorure de sodium----- 10 à 15 g.
- ✓ Eau ----- 01 l.

Bouillon cœur cervelle :

- ✓ Peptone pepsique de viande ----- 10.0 g.
- ✓ Extrait de cervelle ----- 12.5 g.
- ✓ Extrait de cœur ----- 5.0 g.
- ✓ Glucose ----- 2.0 g.
- ✓ Chlorure du sodium ----- 5.0 g.
- ✓ Hydrogénophosphate disodique (Na₂HPO₄) ----- 2.5 g.

- ✓ Eau ----- 1000 ml.

Milieu de Muller Hinton :

- ✓ Peptone ----- 11.0 g.
- ✓ Extrait de viande ----- 1.0 g.
- ✓ Chlorure du sodium ----- 75.0 g.
- ✓ Mannitol ----- 10 g.
- ✓ Rouge de phénol ----- 0.025 g.
- ✓ Agar----- 15 g.
- ✓ Eau distillé -----1000 ml.

Plasma du lapin :

On prend le sang de lapin et on ajoute de citrate de sodium pour séparer le plasma dans la centrifugeuse.

Annexe 02 : Les colorants

1. Lugol :

- ✓ Iode ----- 05.0 g.
- ✓ Lodure de potassium ----- 10.0 g.
- ✓ Eau distillé ----- 1000 ml.

2. Fuschine :

- ✓ Fuschine basique ----- 33.3 g.
- ✓ Phénol ----- 66.6 g.
- ✓ Ethanol 0.95----- 166 cm³.
- ✓ Eau distillé ----- 1000 ml.

3. Violet de gentiane

- ✓ Violet de gentiane ----- 10.0 g.
- ✓ Phénol ----- 20g.
- ✓ Ethanol 0.85 -----100 cm³.
- ✓ Eau distillé ----- 1000 ml.

Biotype	Staphylokinase (K)	Hémolysine B (H)	Plasma bovin coagulé en 6h (BC)	Type cristal violet (CV)
Hôte spécifié				
Humain	+	-	-	A ou C
Humain B positif aviaire	+	+	-	A ou C
Environnement à battoire Bovin	-	-	-	A
	-	+	+	A
Ovin	-	+	+	C
Hôte non spécifié				
- HNS	+	-	+	A
- HNS	+	+	+	A
- HNS	-	+	-	A
- HNS	-	+	-	C
- HNS	-	-	-	C

Tableau : schéma simplifié des biotypes de staphylococcus aureus ;(joseph pierre ;2004)

Norme ISO06888-1 : Microbiologie des aliments, méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces), partie 1 : technique utilisant le milieu gélose de Baird-Parker