

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université BLIDA 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Microbiologie et Toxicologie Alimentaire

Thème :

Recherche dans les plats cuisinés des souches bactériennes impliquées dans les toxi-infections alimentaires et évaluation des performances du MALDI-TOF-MS dans leur identification.

Présenté par :

DJAFER CHERIF Meriem

BOUALI Amel

Soutenu le : /09/2017

Membres de jury :

| | | | |
|------------------------------|-----------------------|--------|---------------|
| M ^{me} EDDAIKRA. A | Maitre assistante A | USDB 1 | Présidente |
| M ^{me} KANANE. A | Maitre assistante A | USBD 1 | Examinatrice |
| Mr BOUMEHIRA. A.Z | Maitre de Recherche B | CRAPC | Promoteur |
| M ^{me} CHELGHOUM. H | Maitre assistante A | USBD 1 | Co-promotrice |
| Mr. BENSEFIA. S.A | Docteur vétérinaire | IPA | Co-promoteur |

Année universitaire : 2016/2017

Remerciements

On remercie en premier lieu, **Dieu le tout puissant, le miséricordieux** de nous avoir illuminé et ouvert les portes du savoir et de nous avoir donné la force, le courage et la volonté pour surmonter les épreuves qu'on a rencontrée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

En préambule à ce manuscrit de mémoire, on tient à remercier sincèrement l'ensemble des personnes ayant permis sa réalisation, on exprime nos profondes gratitudes à :

Notre promoteur Mr **BOUMEHIRA. A.Z** (maitre de recherche B CRAPC) pour son effort fourni, son encadrement, ses encouragements, sa disponibilité et leurs persévérances dans le suivi de ce projet, sa patience et sa grande confiance en nos capacités intellectuels.

Monsieur **BENSIFIA. S.A** et à toute l'équipe de laboratoire de bactériologie alimentaire du l'institut pasteur d'Algérie, de nous avoir fait l'honneur de nous accueillir, orienter et encourager pour ce projet de fin d'étude.

Madame **CHELGHOUH.H** pour l'intérêt que vous avez porté à notre travail, pour votre disponibilité, vos conseils et votre aide qui ont permis son aboutissement.

Les membres du jury à commencer par M^{me} **EDDAIKRA. A** qui nous a fait l'honneur de présider notre jury. M^{me} **KANANE.A** d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Nous adressons les remerciements à :

Monsieur **OUSSAADOU. L** pour votre confiance, d'avoir accepté un jour de nous donner une chance pour nous mettre sur les rails.

Nous ne pouvons achever ce mémoire sans exprimer notre gratitude à tous les professeurs de faculté S.N.V .Université de BLIDA1 pour leur dévouement et leur assistance tout au long de nos études universitaires.

En fin, Tous les étudiants de notre promotion pour la bonne ambiance, les conseils et les encouragements.

Dédicaces

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tout simplement que je dédie ce modeste travail à :

Ma Mère Fatiha

Tu représentes pour moi la source de Tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Mon très cher Père Abd el Kader

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation le long de ces années.

Mes frère Amine et Salah Eddine

Aucune expression ne saurait témoigner de l'amour que je vous porte que dieu vous donnera du bonheur et réussite.

Ma très chère sœur Nadjia et son mari Toufik

sans oublier leurs enfants « Maria et Mouad »

Mon binôme Meriem et à toute sa famille.

A tous mes camarades de Master avec qui j'ai passé de bons Moments.

A Tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.



AMEI

Dédicaces

A mes chers parents

Aucun mot, aucune expression aucun remerciement ne saurait exprimer ma gratitude et ma reconnaissance pour tout ce que vous m'avez offert, pour tout ce que vous avez enduré pour que je puisse être là où je suis maintenant.

A ma sœur Selma et mon frère Abd El Rahim

Aucune expression ne saurait témoigner de l'amour que je vous porte que dieu vous donnera du bonheur et réussite

A toute ma famille

Votre aide et votre attachement familial resteront la lumière qui éclairera mon chemin. Je ne vous remercierais jamais assez pour ce que vous faites pour moi. Que ce travail soit le témoignage de mes sentiments les plus sincères et les plus affectueuses. Merci pour tous vos efforts et vos sacrifices afin de me soutenir dans mes études.

A mon binôme et sa famille

J'ai l'honneur de partager ce travail ainsi que les moments agréables à ses côtés que dieu nous protège et on restera les deux inséparables « Inch'Allah ».

A mon amie, Amina et à mes chères amies

Je vous dédie ce travail en témoignage de notre amitié que j'espère durera toute la vie. Dans l'impossibilité de citer tous les noms, mes sincères remerciements vont à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont permis par leurs conseils et leurs compétences la réalisation de ce mémoire.

A mon cher Redha

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour votre encouragement et affection. Je ne saurais oublier le soutien dont vous m'avez doté. Que Dieu vous accorde joie, santé et bonheur.



Meriem

Résumé

Les toxi-infections alimentaires représentent un problème majeur pour la santé de consommateur. L'intérêt de notre recherche est de permettre une détection rapide de quatre agents pathogènes impliqués dans les toxi-infections alimentaires (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Salmonella* spp.) isolées à partir des plats cuisinés.

Au cours de notre étude, un total de 51 plats cuisinés collectés à partir des restaurants, cantines universitaires et entreprises au niveau de trois wilaya (Blida, Alger et Tipasa) ont été analysés pour rechercher la présence de ces germes par des méthodes conventionnelles et la technologie d'identification bactérienne MALDI-TOF-MS.

Les résultats montrent que 21.56 % des échantillons collectés contenaient au moins un des germes recherchés. *L. monocytogenes* était la plus fréquemment présente dans 11.76% des plats, suivie par *S. aureus* (5.8 %) et *E. coli* (5.8 %). Alors que nous avons enregistré une absence de *Salmonella* spp. à la limite de la méthode utilisée.

Les résultats d'identification bactérienne obtenus par le spectromètre MALDI-TOF-MS étaient à 100% comparables à ceux obtenus par les méthodes conventionnelles. Dans le cas des épidémies alimentaires, l'identification rapide des isolats microbiens d'origines alimentaires par le MALDI-TOF-MS et la suppression de la source infectieuse permettant aux autorités de rétablir la sécurité sanitaire de consommateur.

Mots clés :

Toxi-infection alimentaire, Plats cuisinés, *Listeria monocytogenes*, MALDI-TOF-MS

Abstract

Foodborne illness is a major health problem for consumers. The interest of our research is to allow rapid detection of four pathogens involved in foodborne illnesses (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp.) Isolated from cooked dishes.

In the course of our study, 51 cooked dishes collected from restaurants, university canteens and companies in three wilaya (Blida, Alger and Tipasa) were analysed for the presence of these germs by reference methods and bacterial identification technology MALDI-TOF-MS.

The results show that 21.56% of the collected samples contained at least one of the seeds sought. *L. monocytogenes* was most frequently present in 11.76% of the dishes, followed by *S. aureus* (5.8%) and *E. coli* (5.8%). While we recorded an absence of *Salmonella* spp. At the limit of the method used.

The bacterial identification results obtained by the MALDI-TOF-MS spectrometer were 100% comparable to those obtained by conventional methods. In terms of food safety, in the case of food epidemics, the rapid identification of foodborne microbial isolates by MALDI-TOF-MS and the elimination of the infectious source allowing authorities to restore consumer safety.

Key words:

Foodborne illness, cooked dishes, *Listeria monocytogenes*, MALDI-TOF-MS

ملخص:

يشكل التسمم الغذائي مشكلة صحية رئيسية بالنسبة للمستهلكين. الهدف من بحثنا هو الكشف المبكر عن الجراثيم المسببة للتسممات الغذائية (*Salmonella*، *Escherichia coli*، *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes*) التي تم عزلها من الأطباق المطبوخة.

أثناء دراستنا، 51 طبق تم جمعهم من المطاعم الخاصة، الجامعات والشركات على مستوى ثلاثة ولايات (البلدية، الجزائر وتيبازة) وتم فحصهم للبحث عن وجود البكتيريا مستعملين الطرق التقليدية والتكنولوجيا MALDI-TOF-MS.

بينت نتائج البحث ان 21.56% من العينات التي تم جمعها تحتوي على الأقل واحد من الجراثيم المطلوبة، كما أظهرت ان *L. monocytogenes* هي الأكثر حضورا بنسبة تقدر بـ 11.76% متبوعة بـ 5.8% من *S. aureus* و 5.8% من *E. coli* مع غياب *Salmonella spp.* في حدود الطريقة المستخدمة.

كما ان نتائج التعرف على البكتيريا التي تم الحصول عليها عن طريق MALDI-TOF-MS 100% مطابقة للنتائج المتحصل عليها بالطرق التقليدية. في حالة الأوبئة الغذائية، الكشف السريع للبكتيريا المعزولة من الأغذية بواسطة MALDI-TOF-MS وقمع مصدر العدوى يمكن السلطات من استعادة سلامة المستهلك.

الكلمات المفتاحية:

التسمم الغذائي، الأطباق المطبوخة، *Listeria monocytogenes*، MALDI-TOF-MS

Liste des abréviations

ATCC : American Type Culture Collection.

Aw : Activité de l'eau.

B.H.I.B : Brain-Heart Infusion Broth.

BTS : Bacterial Test Standard.

DIM: Différenciation *Listeria innocua* / *Listeria monocytogenes*.

EPT : Eau Péptoné Tamponné.

HCCA : α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid.

ISO : International Standard Organisation.

JOA : Journal Officiel Algérien.

m/z : Rapport masse sur charge.

MALDI : *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization*.

MOA : Maladies d'origine alimentaire.

MS : Spectrométrie de masse.

OCLA : *Oxoid Chromogenic Listeria Agar* (ISO).

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

rpm: Rotation par minute.

TBX : Tryptone Bile X glucuronide.

TIA : Toxi-infections Alimentaires.

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective.

TOF : Time Of Flight.

TSE :Tryptone Sel Eau.

TSI : Triple Sugar Iron.

Liste des tableaux

| | | |
|-----------------------|--|------------|
| Tableau I : | Réservoirs et voies de contamination des principaux agents des toxi-infections alimentaires. | p4 |
| Tableau II : | Différenciation des souches <i>L. monocytogenes</i> des autres espèces du genre <i>Listeria</i> , en pourcentage de réaction positif, à l'aide de la galerie API <i>Listeria</i> . | p7 |
| Tableau III : | Caractéristiques de la listériose. | p8 |
| Tableau IV : | Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques. | p10 |
| Tableau V : | Avantages et limites de MALDI-TOF-MS pour l'identification microbienne. | p19 |
| Tableau VI : | Type des diluants utilisés. | p21 |
| Tableau VII : | Signification des scores obtenus par MALDI-TOF-MS. | p29 |
| Tableau VIII : | Caractéristiques et identification des souches <i>L. monocytogenes</i> isolées à partir des plats cuisinés. | P35 |
| Tableau IX : | Caractéristiques et identification des souches <i>S. aureus</i> isolées à partir des plats cuisinés. | P38 |
| Tableau X : | Caractéristiques et identification des souches <i>E. coli</i> isolées à partir des plats cuisinés. | P42 |
| Tableau XI : | Présence/absence des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés à base de viande. | P44 |
| Tableau XII : | Présence/absence des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés à base de légume. | P45 |

Liste des figures

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Figure 1 : | Evolution du taux d'incidence des toxi-infections alimentaires en Algérie entre 2000-2015. | p3 |
| Figure 2 : | Source et voies de transmission des germes impliquées dans les toxi-infections alimentaires, Avec modification. | p5 |
| Figure 3 : | Classification du genre <i>Salmonella</i> . | p13 |
| Figure 4 : | Schéma de principe d'un spectromètre de masse. | p15 |
| Figure 5 : | Principe de l'ionisation douce dans le spectromètre MALDI-TOF-MS. | p17 |
| Figure 6 : | Identification des colonies microbiennes par MALDI-TOF-MS. | p18 |
| Figure 7 : | La préparation de la solution mère. | p22 |
| Figure 8 : | Protocole de l'Analyse par MALDI-TOF-MS Biotyper. | p30 |
| Figure 9 : | Aspect du bouillon Fraser après 24h d'incubation. | p31 |
| Figure 10 : | Aspect des colonies de la souche <i>L. monocytogenes</i> LMPC 55 sur milieu OCLA. | p31 |
| Figure 11 : | Observation microscopique après coloration de Gram de la souche <i>L. monocytogenes</i> LMPC 55 (Grossissement x 1000). | p32 |
| Figure 12 : | Test d'hémolyse de la souche <i>L. monocytogenes</i> LMPC55 sur gélose au sang à 7%. | p32 |
| Figure 13 : | Résultats d'identification biochimiques de <i>L. monocytogenes</i> LMPC55 sur galerie API <i>Listeria</i> . | p33 |
| Figure 14 : | Spectre MALDI-TOF-MS de la souche <i>L. monocytogenes</i> LMPC55. | p34 |
| Figure 15 : | Score d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce <i>L. monocytogenes</i> . | p34 |
| Figure 16 : | Enrichissement dans un bouillon TSE. | P36 |
| Figure 17 : | Colonies caractéristiques obtenues après ensemencement sur gélose Baird Parker. | P36 |

| | | |
|--------------------|---|------------|
| Figure 18 : | Purification sur glose Chapman. | P36 |
| Figure 19 : | Observation microscopique après coloration de Gram de la souche STPC 29 (Grossissement X1000). | P37 |
| Figure 20 : | Test coagulase de la souche STPC 29. | P37 |
| Figure 21 : | Spectre MALDI-TOF-MS de la souche <i>S. aureus</i> STPC29. | P38 |
| Figure 22 : | Score d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce <i>S. aureus</i> . | P39 |
| Figure 23 : | Souches suspectent d'appartenir à l'espèce <i>E. coli</i> sur milieu TBX. | P40 |
| Figure 24 : | Purification d'une souche <i>E. coli</i> sur milieu <i>E.coli Coliforms Chromogenic medium</i> . | P40 |
| Figure 25 : | Observation microscopique après coloration de gram de la souche ECPC57 (Grossissement x 1000). | P40 |
| Figure 26 : | Résultats d'identification biochimiques de <i>E. coli</i> ECPC 74 sur galerie API 20 E. | P41 |
| Figure 27 : | Spectre MALDI-TOF MS de la souche <i>E. coli</i> ECPC 74. | P41 |
| Figure 28 : | Score d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce <i>E. coli</i> . | P43 |
| Figure 29 : | Pourcentage de présence/absence des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés. | P46 |
| Figure 30 : | Nombre des plats contaminés par les germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires par espèce. | P46 |

SOMMAIRE

Résumé

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction 1

Chapitre I : Bibliographie

I.1. Maladies d'origines alimentaires (MOA).....2

I.2. Toxi-infections alimentaires (TIA).....2

I.3. Toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)2

I.4. TIAC en Algérie2

I.5. Sources et voies de transmission des TIA3

I.6. Plats cuisinés et risques alimentaires5

I.7. Microorganismes à l'origine des TIA6

I.7.1. *Listéria monocytogenes*6

I.7.2. *Staphylococcus aureus*8

I.7.3. *Escherichia coli*10

I.7.4. Salmonelles12

I.8. Technologie MALDI-TOF-MS14

I.8.1. Historique de spectromètre MALDI-TOF-MS15

I.8.2. Principe général d'un spectromètre de masse15

I.8.3. Principe de la technique MALDI : Ionisation douce16

I.8.4. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF16

I.8.5. Identification des microorganismes par MALDI-TOF-MS17

| | |
|--|----|
| I.8.6. Avantages et limites de la technologie MALDI-TOF-MS dans l'identification des microorganismes | 19 |
|--|----|

Chapitre II : Matériel et méthodes

| | |
|----------------------------------|----|
| Objectif du travail | 20 |
|----------------------------------|----|

II.1. Matériel

| | |
|-----------------------------------|----|
| II.1.1. Matériel biologique | 20 |
|-----------------------------------|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| II.1.1.1. Plats cuisinés..... | 20 |
|-------------------------------|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| II.1.1.2. Souches microbiennes | 20 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|---------------------------------------|----|
| II.1.2. Matériel non biologique | 20 |
|---------------------------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| II.1.2.1. Equipements..... | 20 |
|----------------------------|----|

| | |
|---|----|
| II.1.2.2. Milieu de culture et réactif..... | 21 |
|---|----|

II.2. Méthode

| | |
|---|----|
| II. 2.1. Prélèvement d'échantillons | 21 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2. Recherche et isolement des souches microbiennes..... | 21 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.1. Préparation de la solution mère..... | 21 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.2. Recherche de <i>L. monocytogenes</i> | 22 |
|--|----|

| | |
|---------------------------------|----|
| II.2.2.2.1. Enrichissement..... | 22 |
|---------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| II.2.2.2.2. Isolement sur milieu chromogénique..... | 22 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.2.3. Identification biochimique des souches <i>L. monocytogenes</i> | 23 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| II.2.2.3. Recherche de <i>S. aureus</i> | 24 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.2.2.3.1. Enrichissement dans un bouillon TSE | 24 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.3.2. Ensemencement sur gélose Baird Parker..... | 24 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.3.3 Identification biochimique de la présence de <i>S. aureus</i> | 25 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| II.2.2.4. Recherche de <i>E. coli</i> | 25 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| II.2.2.4.1. Préparation de la suspension mère | 26 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| II.2.2.4.2. Ensemencement en profondeur | 26 |
| II.2.2.4.3. Identification biochimique de <i>E. coli</i> | 27 |
| II.2.2.5. Recherche des salmonelles..... | 27 |
| II.2.2.5.1. Pré-enrichissement..... | 27 |
| II.2.2.5.2. Enrichissement..... | 27 |
| II.2.2.5.3. Isolement..... | 28 |
| II.2.2.5.4. Identification biochimique des salmonelles..... | 28 |
| II.2.3. Evaluation des performances d'un spectromètre MALDI-TOF-MS Microflex LT dans l'identification bactérienne des souches recherchées..... | 28 |

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Résultats

| | |
|---|----|
| III.1.1. Résultats de la recherche de <i>L. monocytogenes</i> | 31 |
| III.1.2. Résultats de la recherche de <i>S. aureus</i> | 36 |
| III.1.3 Résultats de la recherche de <i>E. coli</i> | 39 |
| III.1.4. Résultats de la recherche de <i>Salmonella</i> spp..... | 43 |
| III.1.5. Qualité microbiologique des plats cuisinés..... | 44 |
| III.2. Discussion | 47 |

| | |
|-------------------------|----|
| Conclusion | 50 |
|-------------------------|----|

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Introduction

Les aliments que nous consommons peuvent contenir des substances ou des agents pathogènes dangereux. Certains microorganismes représentent une menace potentielle pour la santé humaine et sont considérés comme les principales sources de maladies d'origine alimentaire. Le botulisme, la campylobactériose, l'infection par *E. coli*, l'infection par *S. aureus*, la salmonellose, la listériose et le choléra sont particulièrement préoccupants par rapport à la sécurité alimentaire dans la plupart des pays (**Buisson et al., 2008 ; Srey et al., 2013**).

L'assurance de la sécurité alimentaire dans les différentes chaînes alimentaires, comme les industries, les hôtels et les restaurants, peut être réalisé grâce à un suivi et une surveillance rigoureux (**Akhtar et al., 2014**). Il est important de détecter les agents pathogènes afin de prévenir les toxi-infections alimentaires. Cependant, les méthodes classiques utilisées pour la détection sont longues et laborieuses. Par conséquent, une variété de méthodes ont été développées par les chercheurs pour la détection rapide des agents pathogènes. Parmi ces méthodes le MALDI-TOF-MS, qui est une technologie rapide, précise, à haut débit et applicable à une large gamme de bactéries (**Law et al., 2014 ; Patel, 2015**).

L'objectif de ce travail est la recherche des souches bactériennes impliquées dans les toxi-infections alimentaire dans des plats cuisinés collectés de différents restaurants, cantines universitaires et entreprises au niveau de trois wilaya (Blida, Alger et Tipasa) et évaluer les performances de le spectromètre MALDI-TOF-MS dans la détection de ces souches.

Ce mémoire est structuré en trois chapitres : le premier fait est une recherche bibliographique sur les toxi-infections alimentaire, des généralités sur les quatre germes pathogènes (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp.) et le principe de la nouvelle technologie MALDI TOF-MS dans l'identification bactérienne. Le second chapitre est dédié aux méthodes conventionnelles et le spectromètre MALDI-TOF-MS dans l'identification de ces germes. La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats obtenus et leur discussion. Enfin, une conclusion générale et quelques perspectives de recherche clôturent ce mémoire.

Bibliographie

I. Bibliographie

I.1. Maladies d'origine alimentaire (MOA)

Les maladies d'origine alimentaires représentent un problème de santé publique de plus en plus important. En 2015, l'organisation mondiale de la santé (OMS), estime qu'une (01) personne sur dix (10) tombe malade en consommant des aliments contaminés et que 420 000 en meurent. Le risque est particulièrement élevé chez les enfants de moins de cinq ans et 125 000 meurent chaque année de MOA. Du point de vue géographique, l'Afrique et l'Asie du Sud-Est sont les régions les plus touchées par ce fléau (OMS, 2015 ; Chaiba et Filali, 2016).

I.2. Toxi-Infections Alimentaires (TIA)

Parmi les MOA, les toxi-infections alimentaires représentent le risque le plus élevé. En effet, depuis quelques années une hausse d'incidence des maladies dues aux agents pathogènes comme les staphylocoques, salmonelles et *Escherichia coli* entérohémorragique a été enregistrée dans les pays en développement. Ces contaminants microbiologiques sont le plus souvent transmis par les aliments ou par l'eau. En plus, avec la tendance croissante à consommer des aliments préparés en dehors du foyer sont autant de facteurs qui contribuent à accroître l'incidence des toxi-infections dues à des micro-organismes (OMS, 2002 ; Bhatt et al., 2016 ; Chaiba et Filali, 2016).

I. 3. Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC)

Les toxi-infections alimentaires collectives sont fréquentes et parfois graves. Un foyer de TIAC est défini par l'apparition d'au moins deux cas d'une symptomatologie similaire, en général digestive, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire. La surveillance, le contrôle et la prévention des TIAC nécessitent une collaboration étroite entre les médecins, les vétérinaires, les épidémiologistes et les professionnels de la restauration collective et du secteur agro-alimentaire (Malvy et al., 1998 ; Malvy et al., 2003 ; De la loire, 2015).

I. 4. TIAC en Algérie

En Algérie, les intoxications alimentaires collectives, bien que sous déclarées, touchent chaque année entre 3000 à 4000 personnes (APS, 2015). Ces intoxications alimentaires collectives notifiées se produisent lors des fêtes et rassemblements familiaux dans près de 40 % des cas, tandis que 60% sont le fait de la restauration collective notamment dans les établissements scolaire et universitaires. Les aliments le plus souvent incriminés sont :

Les pâtisseries, la viande hachée, les œufs et les produits laitiers. La **figure 1**, montre l'évolution du taux d'incidence des TIA en Algérie entre 2000-2015. En 2015, 5191 cas de toxi-infections ont été déclarés, avec 10 décès (**MSPRH, 2015**).

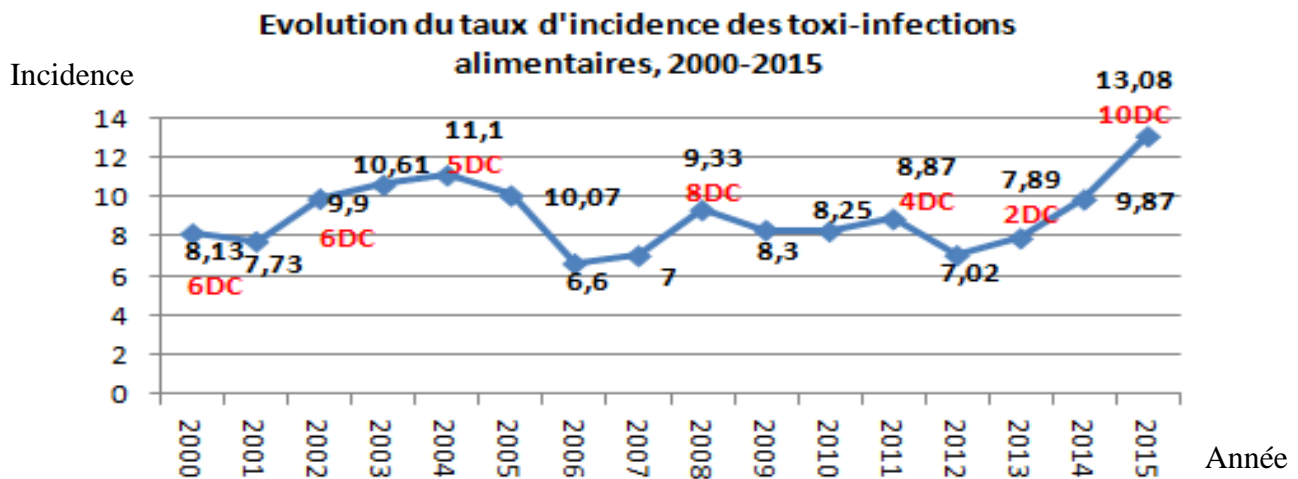


Figure 1 : Evolution du taux d'incidence des Toxi-infections alimentaires en Algérie entre 2000-2015 (**MSPRH, 2015**). DC : décès.

I. 5. Sources et voies de transmission des TIA

Les TIA sont dues à la consommation d'aliments contaminés par des germes microbiens pathogènes (*E. coli* O157 :H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*...) et/ou leurs produits (**Lee et al., 2014**). Quelques agents pathogènes impliqués dans les TIA sont représentées dans le **tableau I**.

Tableau I : Réservoirs et voies de contaminations des principaux agents des Toxi-infections alimentaires (**Hance et al., 1998**).

| Agents pathogènes | Principaux réservoirs | Mode de transmission | | |
|--------------------------------|--------------------------|----------------------|----------|--------------|
| | | Eau | Aliments | Interhumaine |
| <i>Bacillus ceures</i> | Sol | - | + | - |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Caprins | + | + | + |
| <i>Clostridium perfringens</i> | Sol, Animaux, homme | - | + | - |
| <i>Escherichia coli</i> : | | | | |
| Entérotoxinogène | Homme | + | + | + |
| Entéropathogène | Homme | + | + | ? |
| Entéro-invasif | Homme | + | + | + |
| Entéro-hémorragique | Bovins, ovins, volailles | + | + | - |
| <i>Salmonella typhi</i> | Homme | + | + | + |
| <i>Salmonella non typhi</i> | Animaux, homme | + | + | + |
| <i>Shigella</i> spp. | Homme | + | + | + |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Homme | - | + | +/- |
| <i>Vibrio cholerae</i> | Homme, fruits de mer | + | + | + |
| <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | Eau, fruits de mer | + | + | - |
| <i>Yersinia entérocolitica</i> | Eau, animaux | + | + | - |

Les agents pathogènes peuvent être transmis à l'homme par diverses voies : l'air, l'eau, des contacts interhumains directs et les aliments. Certains peuvent aussi être transmis aux aliments par des animaux ou par des équipements divers, ainsi que la contamination croisée lors de la préparation de la nourriture provoque aussi des infections (**Hance et al., 1998 ; Bhatt et al., 2016**). La **figure 2** montre les sources et les voies de transmission des germes impliqués dans les TIA.

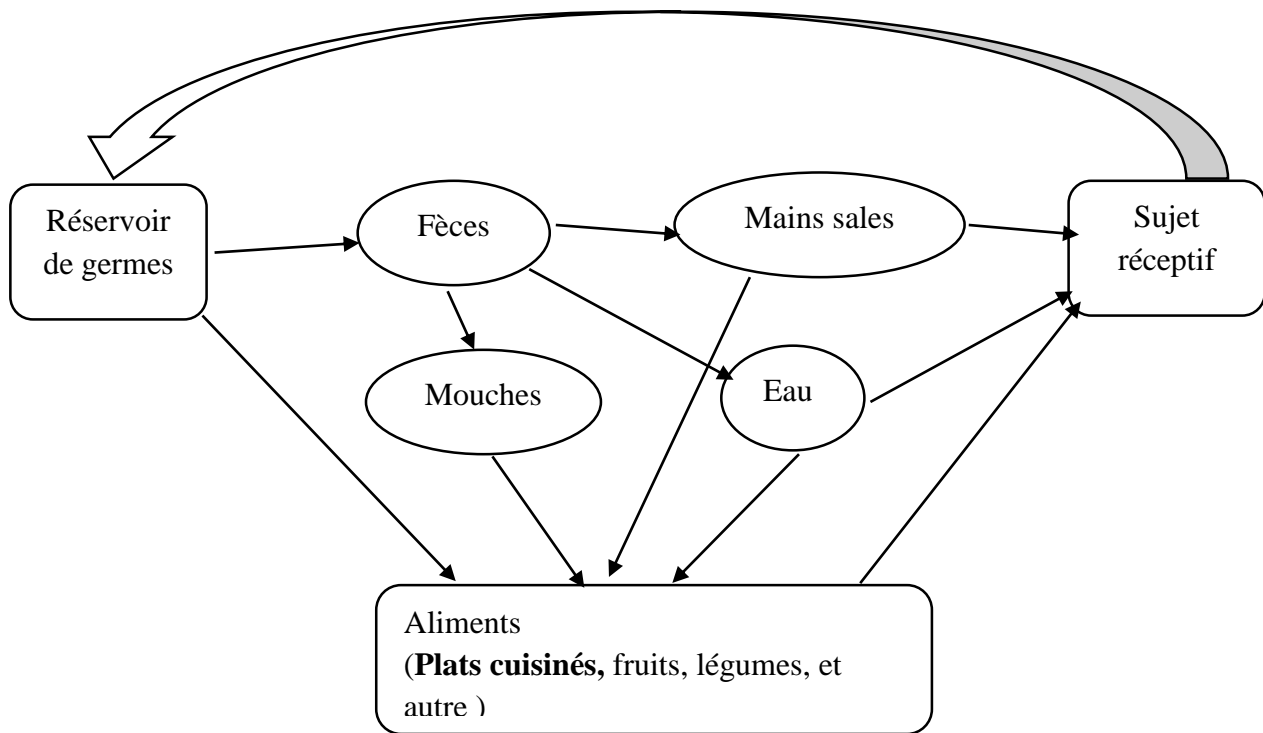


Figure 2 : Source et voies de transmission des germes impliqués dans les Toxi-infections alimentaires (**Hance et al., 1998**), Avec modification.

I.6. Plats cuisinés et risques alimentaires

Les plats cuisinés peuvent présenter des risques au niveau de la consommation. En effet, presque tous les microorganismes agents d'intoxications alimentaires sont susceptibles d'y être rencontrés. Ils apparaissent comme une des catégories d'aliments les plus fréquemment incriminés dans les cas d'intoxications alimentaires recensés (en deuxième position après les produits carnés). Le problème des intoxications liées aux plats cuisinés doit être pris très au sérieux, car du stade artisanal, cette production est passée au stade industriel. Ils sont consommés d'une façon de plus en plus collective (**Multon et al., 1991**).

Selon, le journal officiel Algérien (JOA), les critères microbiologiques recherchés dans les plats cuisinés à base de viandes et de poissons sont les germes aérobies à 30°C, les coliformes, les coliformes fécaux, *S. aureus*, *Clostridium* sulfito-réducteurs à 46°C et *Salmonella*. Alors que dans les plats cuisinés à base de légumes, deux germes sont recherchés : *S. aureus* et *Salmonella* (**JOA, 1998**).

I.7. Microorganismes à l'origine des TIA

Différentes espèces microbiennes peuvent être à l'origine des TIA.

I.7.1. *Listéria monocytogenes*

I.7.1.1. Historique

L. monocytogenes été décrit en 1926 par Murray et *al.*, Le nom officiel de *L. monocytogenes* a été adopté en 1940 par la sixième édition du Manuel *Bergey* de Bacteriologie. (**Hernandez-Milian et Payeras-Cifre, 2014**). En 1981, elle a été identifiée pour la première fois comme un agent pathogène d'origine alimentaire (**Todd et Notermans, 2011**).

I.7.1.2. Taxonomie

Du point de vu taxonomique *L. monocytogenes*, appartient au domaine : *Bacteria*, Phylum XIII : *firmicutes* ou bactéries à Gram +, Classe : *Bacilli*. Ordre : *Bacillales*, Familles : *Listériaceae*, Genre : *Listeria* (**Delarras, 2014**). Dix espèces du genre *Listeria* sont les plus fréquemment identifiés : *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* et, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* et *L. Fleischmannii* sont Les plus récemment reconnu. (**Hage et al., 2014 ; Pusztahelyi et al., 2016**). Parmi ces espèces, seuls *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* sont pathogènes, mais *L. ivanovii* est strictement décrit comme un agent pathogène animal et *L. monocytogenes*, agent causal de la listériose humaine (**Liu et al., 2015**).

I.7.1.3. Habitat

Tous les membres du genre *Listeria* sont largement distribués dans la nature et ont été isolés du sol, de la végétation, des eaux usées, de l'eau, des aliments, des déchets d'abattoirs et des excréments d'animaux sains qui peuvent constituer une source importante de contamination alimentaire et d'infections chez l'homme (**Todd et Notermans, 2011 ; Al kassaa et al., 2016**).

I.7.1.4. Caractères bactériologiques

Listeria est une bactérie Gram positive en forme bacille mesurant 0,4 - 0,5µm de diamètre et de 0,5 à 2,0µm de longueur, avec des extrémités arrondies. Ces bactéries anaérobies facultatives, formant des chaînes simples ou courtes, souvent en forme de "V". *L. monocytogenes* est mobile

en raison de cinq flagelles péritriches (Tourdjman et al., 2014 ; Yehia et al., 2016). C'est une bactérie peu exigeante, très résistante aux conditions de l'environnement, capable de se multiplier à différentes gammes de pH (4-9). Sa croissance optimale se situe entre 30 et 37 °C mais elle possède la capacité de survivre et de se multiplier à basses températures (4-10 °C). Elle n'est pas totalement éliminée par la congélation à -20 °C mais elle est détruite par la chaleur (Tourdjman et al., 2014).

Du point de vue biochimique, *L. monocytogenes* est une bactérie : catalase (+), oxydase (-), nitrate réductase (-). Elle est différenciée facilement des autres espèces à l'aide de la galerie biochimique API *Listeria* (Tableau II) (Delarras, 2014 ; Le Minor et Véron, 1990).

Tableau II : Différentiation des souches *L. monocytogenes* des autres espèces du genre *Listeria*, en pourcentage de réaction positive, à l'aide de la galerie API *Listeria* (Delarras, 2014).

| API <i>Listéria</i> | DIM | ESC | α -MAN | DARL | XYL | RHA | MDG | RIB | G1P | TAG | β -HEM |
|-------------------------|-----|-----|---------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------|
| <i>L. grayi</i> | 99 | 100 | 99 | 100 | 1 | 16 | 33 | 100 | 0 | 0 | - |
| <i>L. innocua</i> | 99 | 100 | 98 | 100 | 2 | 66 | 98 | 0 | 0 | 0 | - |
| <i>L. ivanovii</i> | 88 | 100 | 0 | 99 | 97 | 4 | 99 | 33 | 91 | 0 | ++ |
| <i>L. monocytogenes</i> | 0 | 100 | 98 | 97 | 0 | 98 | 100 | 0 | 5 | 0 | +(-) |
| <i>L. seelgeri</i> | 97 | 100 | 5 | 99 | 99 | 0 | 99 | 0 | 0 | 0 | + |
| <i>L. welshimeri</i> | 90 | 100 | 96 | 100 | 98 | 76 | 99 | 0 | 0 | 0 | - |

DIM : Différentiation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* ; ESC : Esculine ; α -MAN : α -Mannosidase ; DARL : DArabitol ; XYL : D-Xylose ; RHA : L-Rhamnose ; MDG : α -Méthyl-D-Glucoside ; RIB : D-Ribose ; G1P : Glucose - 1 - Phosphate ; TAG : D-Tagatose. β HEM : Hémolyse.

++ : 100%, + : >90%, +(-) : 70-90%, - : < 10 %

I.7.1.5. Pouvoirs pathogènes

L. monocytogenes est l'agent causal de la Listériose, une maladie zoonotique grave résultant de l'ingestion d'aliments contenant ce microorganisme. La maladie peut conduire à des manifestations cliniques telles que la gastro-entérite, la septicémie, l'encéphalite, la méningite et l'avortement (Tableau III). Certains groupes ont un risque plus élevé de développer la maladie, comme les nouveau-nés, les femmes enceintes, les personnes âgées, les patients transplantés, les personnes atteintes d'immunodéficience, y compris les patients atteints de virus

de l'immunodéficience humaine et ceux qui ont un cancer (Camargo *et al.*, 2016 ; Tourdjman *et al.*, 2014 ; de Noordhout *et al.*, 2014)

Tableau III : Caractéristiques de la Listeriose (Anses, 2011a ; Tourdjman *et al.*, 2014).

| Population cible | Principaux symptômes | Durée des symptômes | Nature des aliments contaminés |
|--|--|---------------------|--|
| Toute la population, toutes classes d'âge confondues | Septicémie/bactériémie Méningites, méningoencéphalites | Plusieurs jours | Les aliments consommés crus ou peu cuits tels que les produits de charcuterie, les poissons, le lait cru ou les fromages, ainsi que les aliments subissant une cuisson au cours de leur préparation. mais pouvant être contaminés après cette étape. |
| Femme enceinte | Syndrome pseudo-grippal (fièvres, frissons) Avortement spontané, prématurité Infection néonatale | | |

I.7.2. *Staphylococcus aureus*

I.7.2.1. Historique

En 1882, *Staphylococcus* sp a été décrit pour la première fois par Sir Alexander Ogston qui a observé la présence de cocci dans des lésions purulentes chez les humains. Ces cocci ont formé des grappes de raisin, Ogston a nommé cet organisme *Staphylococcus* (Staphylo signifie raisin en grec). En 1884, Rosenbach a étudié cet organisme en culture pure. Peu de temps après, les staphylocoques sont entrés dans l'histoire de l'intoxication alimentaire avec une grande épidémie dans le Michigan causée par la consommation du fromage (Hennekinne et Le Loir, 2014 ; Argaw et Addis, 2015).

I.7.2.2. Taxonomie

Du point de vue taxonomique, le genre *staphylococcus* appartient au domaine : *Bacteria*, Phylum : *firmicutes*, Classe : *Bacilli*, Ordre : *Bacillales*, Famille : *Staphylococcaceae* et Genre : *Staphylococcus* (Delarras, 2014). Environ 50 espèces et sous-espèces ont été décrites dans le

genre *Staphylococcus*. Elles sont généralement classées en deux groupes en fonction de leur capacité à produire une coagulase. Les staphylocoques à coagulase positifs (CPS), généralement considérés comme pathogènes, et les staphylocoques à coagulase négatifs (CNS), considérées comme étant moins dangereux (Hennekinne et Le Loir, 2014 ; Yves et Michel, 2009). *S. aureus* est mieux connu et souvent impliqué dans l'étiologie de diverses infections toxiques chez l'homme (Argaw et Addis, 2015).

I.7.2.3. Habitat

Les staphylocoques sont des germes ubiquistes qui peuvent vivre :

- En bactéries saprophytes dans la nature (sols, air, eaux, aliments...)
- En bactéries commensales sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux.
- En bactéries pathogènes, agents d'infection humains ou animales (Delarras, 2014).

I.7.2.4. Caractères bactériologiques

Les *S. aureus* sont des cocci Gram positifs mesurant 0,5 à 1,5 µm de diamètre. Ils apparaissent isolés ou des grappes irrégulières semblables à des raisins qui sont immobiles, dépourvu des spores, catalase et coagulases positives et aéro-anaérobies facultatives (da Cunha et Ustulin, 2011). C'est un germe mésophile, capable de se multiplier entre 4 °C et 46 °C, de manière optimale à 37 °C, pour un pH allant de 5 à 9, avec un optimum de 7,2 à 7,6 et une Aw de 0,86 à 0,90. *S. aureus* est aussi un germe halophile, osmophile et xérophile car il se développe même en présence de sel, du sucre et survit dans les aliments déshydratés. Sa croissance est possible jusqu'à une concentration de 18 % en sel (Salifou et al., 2013).

I.7.2.5. Pouvoir pathogène

Bien que *S. aureus* est un parasite habituellement inoffensif de l'homme et de l'animal, il est parfois responsable des infections :

- Les infections suppuratives localisées de la peau et des muqueuses
- Les septicémies correspondent à la multiplication et la dissémination de *S. aureus* dans la circulation sanguine

-Les maladies liées à la production de toxines, principalement les intoxications alimentaires (**Federighi, 2005**).

L'intoxication staphylococcique est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes au monde suite à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (SE) (**Hennekinne et al., 2012**). Ces entérotoxines sont des protéines thermorésistantes produites dans l'aliment en phase exponentielle de la croissance des germes (**Anses, 2011b**). La symptomatologie est brutale : après une période d'incubation courte, ces symptômes apparaissent de façon brusque et violente (**Tableau IV**) (**Leyral et Vierling, 2007 ; Guillet et al., 2002**).

Tableau IV : Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (**Anses, 2011b ; Guillet et al., 2002**).

| Population cible | Principaux symptômes | Durée des symptômes | Nature des aliments contaminés |
|--|--|---------------------|---|
| Toute la population, toutes classes d'âge confondues | Nausées, vomissements, Douleurs abdominales Diarrhées, Vertiges Frissons, Faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée. | 18 - 24 h | Produits cuits contaminés après la cuisson : plats cuisines divers, ou des aliments à faible Aw : salaisons, laits en poudre. |

I.7.3. *Escherichia coli*

I.7.3.1. Historique

En 1885 : Le pédiatre allemand Théodore Escherich décrit pour la première fois, le bacille *Bacterium coli* dans des selles de nourrisson (**Gouali et Weill, 2013**). Après en 1919, Castellani et Chalmers lui donnent son nom définitif *E. coli* en hommage à Escherich, *Escherichia* est ensuite devenu le genre type de la famille des *Entérobactériaceae* et *E. coli* l'espèce de ce genre (**Cohen et Karib, 2006**). En 1945, Bray a démontré que certaines épidémies de diarrhées chez les enfants, non associées à *Salmonella* ou à *Shigella*, ont pour origine des souches de *E. coli* (**Gouali et Weill, 2013**).

I.7.3.2. Taxonomie

L'espèce *E. coli* appartient au domaine : *Eubacteria*, phylum : *Proteobacteria*, classe : *Gammaproteobacteria*, ordre : *Enterobactériales*, famille : *Entérobactériaceae* et genre : *Escherichia* (**Delarras, 2014**).

I.7.3.3. Habitat

E. coli fait partie de la microflore bactérienne normale du tractus digestif de l'homme ainsi que de celle de la plupart des animaux à sang chaud. Elle colonise de façon asymptomatique le tractus digestif des nouveau-nés dès les premières heures de la naissance et constitue ainsi l'espèce bactérienne dominante de la microflore aéro-anaérobie facultative de l'intestin (**Gouali et Weill, 2013**). C'est un indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments (**Delarras, 2014**).

I.7.3.4. Caractères bactériologiques

Les souches de *E. coli* sont de courts bâtonnets mobiles au moyen de flagelles péritriches, Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, non sporulés, mesurant de 2 à 4 µm de long et d'un diamètre d'environ 0,6 µm (**Salifou et al., 2013**). *E. coli* est une bactérie mésophile, son optimum de croissance est proche de la température corporelle des animaux à sang chaud (35-43°C). La congélation ou la surgélation a peu d'effets sur la population des *E. coli* dans un aliment. Elles sont tuées rapidement lorsque la température dépasse 70°C comme dans le processus de pasteurisation. Le pH et l'*a*_w peuvent aussi influencer la multiplication des *E. coli*, l'optimum de croissance est 7,2 et 0,99 respectivement (**Cohen et Karib, 2006**).

Du point de vue biochimique, c'est une bactérie oxydase négative, capable de fermenter plusieurs sucres, mais sa fermentation du lactose avec production de gaz est caractéristique. La production d'indole et la présence d'une activité β-glucuronidase sont aussi des paramètres importants dans l'identification biochimique de cette espèce (**Salifou et al., 2013**).

I.7.3.5. Pouvoir pathogène

Différents groupes ou classes de *E. coli*, sont impliqués dans des syndromes diarrhéiques chez l'homme et les jeunes enfants :

-Les ECEP : *E. coli* entéropathogènes responsables de gastro-entérites infantiles.

-Les ECEI : *E. coli* entéro-invasifs qui ont la propriété de pénétrer dans les cellules et de provoquer des syndromes dysentériques.

-Les ECET : *E. coli* entérotoxigènes qui sécrètent des toxines de deux types, ST (thermostable) et LT (thermolabile), et qui possèdent en outre des facteurs d'adhésion à la

muqueuse intestinale. Ces souches sont responsables de syndromes cholériformes qui touchent principalement les enfants des pays en voie de développement et les voyageurs (« turista »).

-Les ECEH : *E. coli* entérohémorragiques responsables d'épidémies de diarrhées sanglantes d'origine alimentaire pouvant se compliquer de syndrome hémolytique et urémique (SHU) chez l'enfant par la production de Shiga toxine.

-Les ECEA : *E. coli* entéroaggrégatifs responsables de diarrhées chroniques dans les pays en voie de développement

-Les ECAD : *E. coli* à adhésion diffuse qui seraient responsables de diarrhées aqueuses chez l'enfant (Müller et al., 2016).

L'infection à *E. coli* chez l'être humain est souvent due à l'ingestion d'aliments contaminés tels que la viande crue ou mal cuite le lait cru, les sandwiches froids, les légumes et l'eau (Bouvet et Vernozy-Rozand, 2000).

I.7.4. Salmonelles

I.7.4.1. Historique

Le genre *Salmonella*, doit son nom au Dr. Vétérinaire Salmon, bactériologiste américain du 19^{ème} siècle (Korsak et al., 2004). En 1888, Gartner établit le rôle pathogène de bacille qu'il avait isolé et confirma l'étiologie bactérienne de certaines TIA. (Avril et al., 1992 ; Van Oye, 2013).

I.7.4.2. Taxonomie

Les salmonelles appartiennent au domaine : *Eubacteria*, phylum : *Proteobacteria*, classe : *Gammaproteobacteria*, ordre : *Enterobactériales*, Famille : *Entérobacteriaceae* et le genre : *Salmonella* (Delarras, 2014). La classification actuelle suggère qu'il n'y a que deux espèces, à savoir *S. bongori* et *S. enterica*, qui est elle-même divisée en six sous-espèces (*enterica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* et *salamae*). Les anciennes «espèces», *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. cholerasuis* et *S. typhimurium* sont maintenant considérées comme étant

S. enterica subsp. *enterica*. Il existe plus de 2 500 sérotypes dans le genre *Salmonella* (Figure 3) (Fox et al., 2017 ; Akyala et Alsam, 2015).

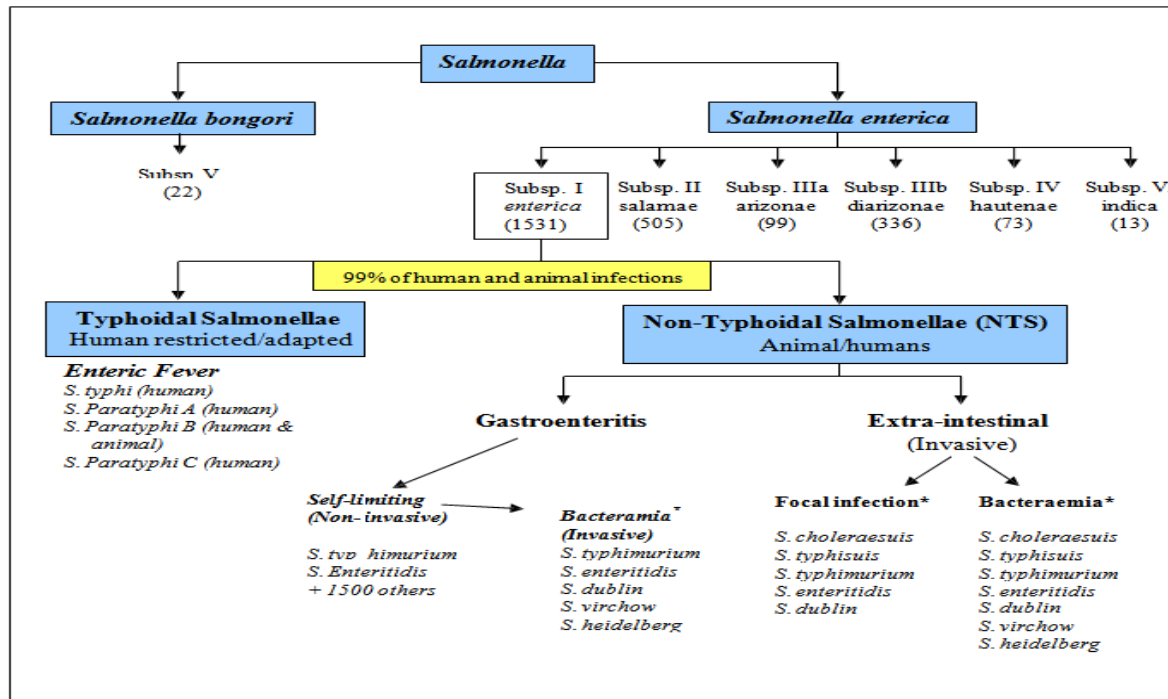


Figure 3 : Classification du genre *Salmonella* (Akyala et Alsam, 2015).

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre total des sérotypes inclus dans chaque sous-espèce.

(*) Les sérotypes communs sont répertoriés, mais d'autres sérotypes peuvent provoquer une bactériémie ou une infection focale ; Subsp : Sous-espèce.

I.7.4.3. Habitat

Les salmonelles peuvent être isolées de l'intestin de nombreuses espèces animales et la dissémination dans l'environnement provient essentiellement de contaminations fécales. Il s'agit d'agents zoonotiques (Korsak et al., 2004).

I.7.4.4. Caractères bactériologiques

Les bactéries du genre *Salmonella* sont des petits bacilles à Gram négatif, aéro-anaérobies facultatives habituellement mobiles par des cils péritriches à l'exception de *S. gallinarum* qui est toujours immobile. Ces bactéries mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, 2 à 5 µm de longueur (Salifou et al., 2013).

Les bactéries de genre *Salmonella* sont des bactéries mésophiles, capables de se développer à des températures optimales entre 35 et 37 °C, elles survivent même en congélation à -18°C, leur pH de croissance compris entre 4,5 et 9 avec un A_w supérieure à 0,93 et la concentration maximale de sel pour la survie est 5.8 % de NaCl (Salifou et al., 2013 ; Richard, 2016).

Les salmonelles réduisent les nitrates en nitrites, fermentent le glucose avec production de gaz (sauf *Salmonella Typhi*) mais ne fermentent pas le lactose, oxydase négative, catalase positive, uréase négative, indole négative, Voges Proskauer négatif, Rouge de méthyle positif, Ortho-NitroPhényl-β-Galactoside (ONPG) négative, H₂S positive (**Federighi, 2005 ; Korsak et al., 2004**).

I.7.4.5. Pouvoir pathogène

La salmonellose est l'une des principales MOA préoccupante pour la santé publique. Elle est considérée comme l'une des zoonoses les plus répandues dans les pays industrialisés et en développement (**Akpabio, 2015**). La salmonellose se manifeste, en fonction de l'hôte et du sérotype, sous forme de portage asymptomatique, de gastroentérite (le plus souvent) ou bien chez les plus fragiles sous forme d'infection systémique sévère (**Le hello, 2014**).

Les salmonelloses peuvent être classées en deux catégories :

-Les fièvres typhoïde et paratyphoïdes, dues à des sérovars strictement humains : *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, et à moindre degré, *S. Paratyphi B*. Les fièvres paratyphoïdes sont généralement moins sévères que la fièvre typhoïde.

-Les TIA et les gastro-entérites, dues à des sérovars ubiquitaires, donc pouvant transiter chez l'homme et chez l'animal (**Leyral et Vierling, 2007**).

L'infection à *Salmonella* chez l'être humain est souvent due à l'ingestion d'aliments contaminés tels que le lait, les fruits de mer et les produits frais, les viandes, surtout hachées, les volailles, les œufs et les produits dérivés telles les pâtisseries et les mayonnaises (**Dallal, 2014 ; Bacha, 2015**).

I.8. Technologie MALDI-TOF-MS

Les méthodes traditionnelles pour la détection des germes pathogènes dans les échantillons alimentaires se révèlent longues et laborieuses. De ce fait, les laboratoires d'analyses préfèrent des techniques plus spécifiques, sensibles, temporelles et économiques que les méthodes traditionnelles de détection. L'identification des microorganismes par le spectromètre MALDI-TOF-MS représente une alternative de choix pour répondre à ce besoin (**Bhatt et al., 2016**).

I.8.1. Historique de spectromètre MALDI-TOF-MS

Le premier spectromètre de masse a été conçu par Francis William Aston en 1919 (**Gravet et Gessier, 2013**), c'est en 1985 que Karas et *al.*, ont utilisé une désorption-ionisation laser assistée par matrice (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - MALDI*) pour ioniser et irradier avec un laser pulsé à 266 nm (**Karas et al., 1985**). Cependant l'avancée réelle de l'utilisation de cette technologie dans l'analyse de protéines et des macromolécules est attribuée aux travaux de Tanaka et *al.*, 1987, qui ont utilisé une matrice de cobalt / glycérol avec un laser à azote à 337 nm pour l'ionisation de biomolécules. Pour ce travail, Tanaka a reçu le prix Nobel de chimie en 2002 (**Tanaka et al., 1988 ; Tanaka, 2003**).

I.8.2. Principe général d'un spectromètre de masse

La spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Elle comporte toujours une source d'ionisation permettant le passage de l'échantillon en phase gazeuse et l'ionisation des molécules, un analyseur séparant les ions en fonction de leur rapport masse/ charge (m/z), un détecteur qui permet une détection des ions préalablement triés et qui fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés, et enfin un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres (**Figure 4**) (**Suarez et al., 2015**).

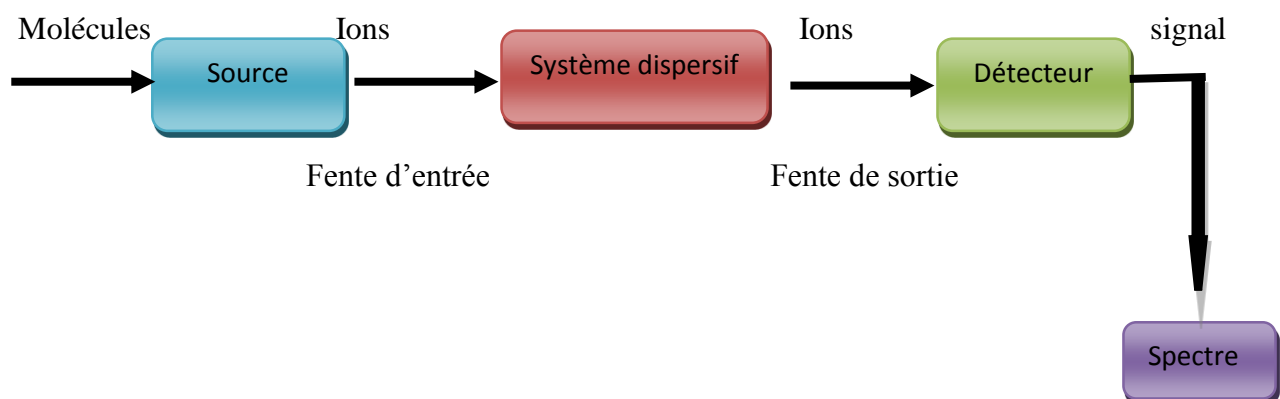


Figure 4 : Schéma de principe d'un spectromètre de masse (**Suarez et al., 2015**).

I.8.3. Principe de la technique MALDI : Ionisation douce

L'ionisation douce est l'étape clef de l'identification bactérienne puisqu'elle permet l'analyse de macromolécules telles que les protéines. La méthode MALDI consiste à mélanger une solution organique saturée de cristaux, appelée matrice, avec un échantillon déposé sur un support (plaque de métal ou plaque jetable). Les deux composés co-cristallisent sous l'effet de l'évaporation. La plaque est introduite dans le spectromètre de masse et le mélange matrice-échantillon cristallisé est irradié brièvement par un faisceau laser (en général un laser à azote de longueur d'onde 337 nm). Pour obtenir un spectre correct, la matrice est essentielle au succès de l'ionisation de l'échantillon : en effet, l'absorption de l'énergie du laser par les molécules de la matrice entraîne la désorption (passage en phase gazeuse) des ions du mélange matrice-échantillon (**figure 5**). Les ions produits par la technique MALDI sont majoritairement mono chargés. Ainsi, les différentes protéines vont se charger positivement ou négativement en fonction de leurs structures peptidiques (**Suarez et al., 2015**).

I.8.4. Principe de la technologie TOF et description du MALDI-TOF

La technique d'ionisation MALDI peut être associée à la technologie TOF (*Time Of Flight*) ou « temps de vol ». Les protéines ionisées passent alors dans un tube de vol maintenu sous vide et « volent » en fonction de leur vitesse et donc de leur masse jusqu'au détecteur qui amplifie le signal, les ions ayant une masse élevée atteindront le détecteur plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Le résultat est traduit sous la forme d'un spectre de masse (**figure 5**) (**Suarez et al., 2015**).

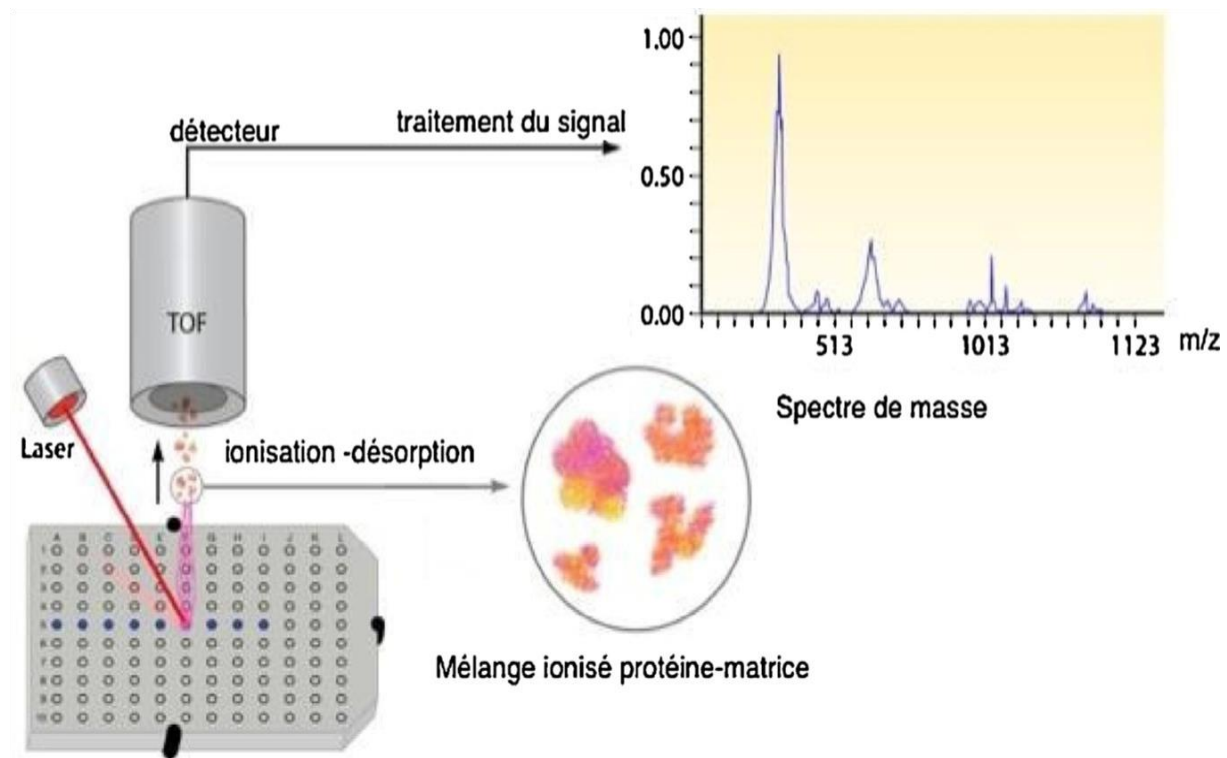


Figure 5 : Principe de l'ionisation douce dans le spectromètre MALDI-TOF-MS (Clark et al., 2013 ; Suarez et al., 2015).

I.8.5. Identification des Microorganismes par MALDI-TOF-MS

Les microorganismes sont composés de différentes biomolécules, telles que les acides nucléiques, peptides, protéines, sucres et les autres petites molécules. De ce fait, la technologie MALDI-TOF-MS peut être utilisée dans l'identification des microorganismes via la génération d'empreintes digitales de protéines (Pavlovic et al., 2013 ; Casasagne et al., 2012). Elle permet de réaliser très rapidement et à moindre coût un diagnostic sur des colonies de bactéries ou de champignons isolés sur des milieux de culture solides (Figure 6) dans le but d'obtenir des spectres de masses reproductibles, permettant d'identifier les germes au niveau de la famille, du genre, de l'espèce, et parfois de la sous-espèce (Suarez et al., 2015).



Figure 6 : Identification des colonies microbiennes par MALDI-TOF-MS (Suarez et al., 2015).

Les colonies bactériennes ou fongiques isolées sur milieu solide (ou concentrées à partir de milieu liquide) sont déposées directement sur la plaque MALDI, puis recouvertes par la matrice. Après séchage, la plaque est introduite dans le spectromètre de masse (Suarez et al., 2015 ; Clark et al., 2013).

Les empreintes digitales de l'échantillon sont ensuite récupérées sous forme de spectre de Masse et comparées avec des spectres de référence dans la base de données. Le logiciel intégré génère une liste des résultats, dans laquelle les espèces avec les empreintes digitales les plus similaires en fonction de leur valeur de score logarithmique. Les résultats pourraient être plus influencés par les milieux de culture ou les variations de la température d'incubation. La qualité de la base de données est un facteur critique supplémentaire qui influence la précision de l'identification. L'utilisation de souches de référence avec un statut taxonomique bien défini est une condition préalable pour une identification fiable (Pavlovic et al., 2013).

I.8.6. Avantages et limites de la technologie MALDI-TOF-MS dans l'identification des micro-organismes

La technologie MALDI-TOF-MS présente l'avantage d'être rapide, fiable et reproductible. En plus, elle est bien adaptée à l'analyse à haut débit avec un faible coût de fonctionnement. Cependant, coût initial de l'équipement est très élevé et les bases de données doivent être améliorées (Tableau V) (Pavlovic et al. 2013 ; Bourassa et Butler-Wu, 2015 ; Dingle et Butler-Wu, 2013).

Tableau V : Avantages et limites de MALDI-TOF-MS pour l'identification microbienne (Pavlovic et al., 2013 ; Bourassa et Butler-Wu, 2015 ; Dingle et Butler-Wu, 2013).

| Avantages | Limites |
|---|---|
| Moins de temps technique requis pour l'identification | Impossible de différencier certains organismes hautement apparentés, comme <i>Shigella</i> spp. et <i>E. coli</i> |
| Faible coût par test | Coût élevé de l'instrument initial |
| Haut débit : Possibilité d'identifier une large gamme de microorganismes sur une plate-forme unique | Nécessite une culture pure ou des colonies bien isolées |
| Fiable et reproductible | La taille des bases de données doit être améliorée |
| Facilité d'utilisation - préparation simple de l'échantillon, mise en place du test et interprétation des résultats | Certains organismes (Ex. Champignons) nécessitent une extraction des protéines avant l'analyse |
| Fonctionne bien ou mieux que les méthodes classiques pour la bonne identification des microorganismes | La capacité à détecter la résistance aux antibiotiques est variable |

Matériel et méthodes

Objectif de travail

Le but de ce travail est la recherche des quatre espèces microbiennes dans les plats cuisinés, deux bactéries à Gram positif (*L. monocytogenes* et *S. aureus*) et deux autres bactéries à Gram négatif (*E. coli* et *Salmonella* spp.) collectés des différents restaurants et cantines, après identification par les méthodes standards, les souches isolées sont identifiées par un spectromètre MALDI-TOF-MS, afin de comparés les résultats entre les deux approches étudiée.

Ce travail a été effectuée au sein de laboratoire de bactériologie alimentaire du l'Institut Pasteur d'Algérie (Dely Brahim, Alger) et la Division Santé du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques – CRAPC (Bouismail, Tipaza) durant la période Février-2017 – Septembre 2017.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Plats cuisinés

51 plats cuisinés de différents types (Salade variée, Soupe de poisson, Hamburger, Haricot, Viande hachée, Chorba, et autres) ont été collectés à partir des restaurants, cantines universitaires et entreprise (**voir Annexe I**).

II.1.1.2. Souches microbiennes

En plus des souches isolées des plats cuisinés, trois (03) souches de références (*L. monocytogenes* ATCC 7644, *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922) ont été utilisées dans la réalisation de ce travail.

II.1.2. Matériel non biologique

II.1.2.1. Equipements

Le matériel utilisé répond à la norme ISO 7218, l'essentiel de l'appareillage comprends : Bec bensun, Balance, homogénéisateur de type stomacher, Etuves (30°C, 35°C et 37°C), Bain marie, Autoclave, Agitateur, Hotte à flux laminaire, Microscope optique et le MALDI-TOF-MS (**voir Annexe II**). Des verreries (Tubes à essais, flacons, Pipettes pasteurs stériles) et consommables (Boites de pétri en plastique, Etaleurs), ont aussi été utilisés dans ce travail.

II.1.2.2. Milieu de culture et réactifs

Pour notre analyse, les réactifs et les milieux de culture utilisés ainsi leurs compositions sont présentées en (**Annexe III**). Leur utilisation et préparation était selon les recommandations de la norme ISO 7218 (**ISO7218, 2007**).

II.2. Méthodes

II.2.1. Prélèvement d'échantillons

En total 51 échantillons ont été prélevés de façon aléatoire à partir des différents sources pour subir une analyse microbiologique. 23 prélèvements ont été réalisés sur des plats à base de viande et 28 prélèvements sur des plats à base de légume (**voir Annexe I**).

Les prélèvements des échantillons des plats cuisinés ont été recueillis dans des sachets stériles avec une quantité approximative de 100 g et transportés au laboratoire dans une glacière. Une fois au laboratoire, les échantillons prélevés ont été conservés au réfrigérateur (4°C) et soumis à l'essai le jour même de la réception.

II.2.2. Recherche et isolement des souches microbiennes

Les quatre espèces microbiennes recherchées dans cette étude (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp.), ont été recherchées selon les recommandations du JOA, les normes standards internationales (ISO) et les manuels d'analyses internes de l'Institut Pasteur d'Algérie.

II.2.2.1. Préparation de la solution mère

Pour la préparation des solutions mère, environ 25 g de l'échantillon sont prélevés stérilement et introduits dans un sac stérile. Après, nous avons ajouté 225ml de diluant, (**Tableau IV**) et (**Figure 7**), et les sacs sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type stomacher pendant 01 min à 250 rpm.

Tableau IV : Types des diluants utilisés.

| Germes | Diluant |
|------------------------------------|----------------------------------|
| <i>E. coli</i> et <i>S. aureus</i> | Bouillon TSE |
| <i>Salmonella</i> spp. | Bouillon EPT |
| <i>L. monocytogenes</i> | Bouillon Fraser + additif Fraser |



Figure 7 : La préparation de la solution mère.

II.2.2.2. Recherche de *L. monocytogenes*

La recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée selon la méthode ISO 11290-1 et le mode opératoire interne de laboratoire (**voir Annexe IV**). Elle nécessite trois étapes successives (**ISO11290, 1996**) :

II.2.2.2.1. Enrichissement

L'enrichissement se fait dans un sac stérile auquel on ajoute un bouillon Fraser réparti en flacons à raison de 225ml avec 2ml de supplément Fraser et 25g de l'échantillon à analyser, le tout est broyé au stomacher et incubé à 30°C pendant 24h à 48h. Après incubation, les bouillons d'enrichissement prennent une coloration foncée qui peut être noire ou brune foncée ce qui indique la présomption de présence de *Listéria*. Le noircissement est dû à l'hydrolyse de l'esculine par certaines souches.

II.2.2.2.2. Isolement sur milieu chromogénique

Un isolement effectué à partir du bouillon d'enrichissement et ensemencé à l'aide d'une anse sur gélose chromogénique sélective *Chromogenic Listeria Agar* (OCLA-ISO) et les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h.

Les colonies de *L. monocytogenes* apparaissent bleues à bleues vertes bien arrondies et convexes avec bords réguliers et sont entourées d'un halo opaque. Il est à noter que des souches *L. ivanovii* peuvent présenter des colonies caractéristiques, de taille néanmoins plus réduites.

II.2.2.2.3. Identification biochimique des souches *L. monocytogenes*

II.2.2.2.3.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram est utilisée pour déterminer la nature de la paroi. Le frottis a été préparé en étalant une goutte de la suspension bactérienne sur une lame. Après fixation, la coloration de Gram a été réalisée selon la méthode normalisée en microbiologie des aliments (**Norme NF ISO 7218**). Dans un premier temps le frottis a été coloré avec le violet de gentiane pendant 1 minute, puis fixée avec lugol (1 minute). Après décoloration à l'alcool à 95°C entre 15 et 30 secondes, une deuxième coloration à la Fuchsine a été réalisée pendant 1 minute. Après séchage, une observation est effectuée au microscope à l'objectif x 100 à immersion.

Remarque : Avec cette coloration double, les bactéries « Gram + » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram- » sont colorées en rose.

II.2.2.2.3.2. Recherche de la catalase

Une goutte d'une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est placée sur une lame de microscope, une colonie est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et émulsionnée doucement dans la solution. L'apparition immédiate de bulles d'oxygène est un signe de la présence de l'enzyme catalase et la souche est dite « catalase positive ».

II.2.2.2.3.3. Recherche de l'oxydase

Dans notre travail, le test oxydase est le BD BBL DrySlide. On a déposé à l'aide d'une pipette pasteur une colonie sur le quadrant. Après 20 secondes, s'il y a changement de couleur du blanc vers le violet, ceci indique la présence de l'enzyme Cytochrome C Oxydase et donc la souche est Oxydase +.

II.2.2.2.3.4. Test d'hémolyse

Les colonies présentant une morphologie caractéristique de *L. monocytogenes* sur gélose chromogène, sont ensemencées en strie sur une gélose au sang de cheval à 7% puis incubées à 37°C pendant 24h, pour la recherche de l'activité hémolytique. Après incubation, les géloses au sang ont été observées sous un éclairage intense, l'apparition d'une zone d'hémolyse légère autour des colonies signifie une hémolyse de type β.

II.2.2.3.5. Galerie API *Listéria*

La galerie API *Listéria* est constituée de 10 micro-tubes contenant des substrats déshydratés qui permettent la réalisation des tests enzymatiques et de fermentations de sucres. La galerie a été inoculée par une suspension d'une opacité égale à 1 Mac Ferland. L'incubation est réalisée à 35 - 37 °C pendant 18 à 24 h. Après la durée d'incubation, La lecture des réactions est réalisée visuellement par des changements spontanés de coloration ou révélés après 3 min de l'addition d'une goutte de réactif ZYM B au test DIM, ce test est essentiel pour la différenciation entre *L. monocytogenes* pour laquelle il est négatif et *L. innocua* pour laquelle il est positif. La lecture des réactions est effectuée sur la base du tableau de lecture fournit par le fabricant (**Annexe V**). L'identification est obtenue grâce un profil numérique API web.

II.2.2.3. Recherche de *S. aureus*

L'analyse microbiologique pour la recherche de *S. aureus* dans les plats cuisinés a été faite selon la méthode ISO 6888-3 (**Annexe VI**). Trois étapes sont nécessaires (**ISO 6888, 2004**) :

II.2.2.3.1. Enrichissement dans un bouillon TSE

Une quantité de 25g d'échantillon à analyser est diluée dans un volume de 225 ml de bouillon TSE et homogénéisée à l'aide d'un stomacher pendant 1 min.

II.2.2.3.2. Ensemencement sur gélose Baird Parker

La gélose Baird Parker est fondue, refroidie et coulée dans une boîte de Pétri. Après solidification de la gélose, 0.2 ml de la suspension mère est étalée soigneusement sur toute la surface de la boîte. L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 h à 48h. Après incubation, deux types de colonies sont observées :

-Les colonies caractéristiques de *S. aureus* sont noires ou grises, brillantes et convexes et entourées d'une auréole d'éclaircissement.

-Les colonies non caractéristiques sont noires ou grises dépourvues d'une zone claire.

II.2.2.3.3. Identification biochimique de la présence de *S. aureus*

II.2.2.3.3.1. Ensemencement sur gélose Chapman

Les colonies caractéristiques sur gélose Baird Parker sont isolées par des stries serrées sur gélose Chapman. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 h à 48 h. Après incubation, l'utilisation du mannitol par les staphylocoques pathogènes se traduira par une acidification du milieu, provoquant le virage au jaune de l'indicateur de pH :

-Les colonies mannitol (+) sont entourées d'une auréole jaune : donc forte suspicion de *S. aureus*.

-Les colonies mannitol (-) ne modifient pas la teinte du milieu : donc le milieu reste rouge.

II.2.2.3.3.2. Coloration de Gram

Réalisée selon le protocole décrit dans la section II.2.2.2.3.1.

II.2.2.3.3.3. Recherche de la catalase

Réalisée selon le protocole décrit dans la section II.2.2.2.3.2.

II.2.2.3.3.4. Recherche de l'oxydase

Réalisée selon le protocole décrit dans la section II.2.2.2.3.3.

II.2.2.3.3.5. Recherche de coagulase

A partir de Baird Parker on prélève une partie de chaque colonie caractéristique et on l'ensemence dans un tube contenant 0,5 ml de bouillon B.H.I.B puis on incube le tube à 37°C pendant 24h. Après incubation, un volume de 0.1ml du bouillon (B.H.I.B) trouble est additionné à 0.3 ml de plasma de lapin et le mélange est incubé à 44°C. La coagulation est examinée après chaque 02 h d'incubation. Si le plasma coagule en 24h, le germe possède une coagulase.

II.2.2.4. Recherche de *E. coli*

L'analyse microbiologique pour la recherche de *E. coli* dans les plats cuisinés a été faite selon la méthode ISO 16649-1 et le mode opératoire interne de laboratoire (**Annexe VII**), elle est composée de 03 étapes (**ISO 16649, 2001**) :

II.2.2.4.1. Préparation de la suspension mère

Elle se fait dans un bouillon (TSE) réparti en flacon à raison de 225 ml auquel on ajoute 25g d'échantillon. Le tout est bien homogénéisé à l'aide d'un Stomacher pendant 1 min.

II.2.2.4.2. Ensemencement en profondeur

Il est réalisé par le dépôt, à l'aide d'une pipette stérile, un inoculum de 1 ml de la suspension mère dans une boîte de pétri stérile. Après, environ 15 ml de milieu TBX sont coulés et mélangés soigneusement avec l'inoculum. Après refroidissement et solidification de la gélose, l'incubation se fait à 44°C pendant 24h et les boîtes sont examinées afin de rechercher la présence des colonies caractéristiques de *E. coli* de couleur bleue verte.

II.2.2.4.3. Identification biochimique de *E. coli*

II.2.2.4.3.1. Coloration de Gram

Réalisée selon le protocole décrit dans la section II.2.2.2.3.1.

II.2.2.4.3.2. Recherche de la catalase

Réalisée selon le protocole décrit dans la section II.2.2.2.3.2.

II.2.2.4.3.3. Recherche de l'oxydase

Réalisée selon le protocole décrit dans la section 2.2.2.3.3.

II.2.2.4.3.4. Ensemencement sur gélose Chromogénique

Les colonies présentant les caractéristiques morphologiques de *E. coli* sur milieu TBX, sont repiquées sur un milieu sélectif « *E.coli Coliforms Chromogenic medium* », coulé dans des boîtes de Pétri. Après incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24 h, les colonies de *E. coli* apparaissent en couleur bleue foncé. Toutes les souches de *E. coli* possèdent une β galactosidase et la plupart d'entre elles possèdent également une β glucuronidase, la présence de cette enzyme est révélée par la présence d'un composé de couleur bleue. L'action simultanée des deux enzymes fait apparaître cette couleur des colonies.

II.2.2.4.3.5. Identification des souches *E. coli* sur Galerie API 20E

L'identification biochimique des souches *E. coli* est effectuée à l'aide d'une galerie API20E. C'est une galerie de 20 microtubes contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser 20 tests biochimiques (enzymatiques ou des fermentations des sucres). La galerie a été inoculée par une suspension bactérienne réalisée à partir d'une colonie prélevée de milieu gélose nutritive transférée dans 5ml d'eau physiologique. Après l'incubation à 37°C pendant 24 h, la lecture des réactions est réalisée visuellement par des changements spontanés de coloration ou révélés par l'addition des réactifs (**Annexe VIII**) :

-Pour le test de Vosges Proskauer (VP) : une goutte de VP1 + une goutte de VP2 (lecture après 10min).

-Pour le test de tryptophane désaminase (TDA) : une goutte de l'additif TDA (lecture immédiate).

-Pour le test indole : une goutte du réactif de Kovacs (lecture immédiate).

Ensuite la lecture des réactions s'est faite à l'aide du catalogue analytique ou d'un logiciel d'identification API web.

II.2.2.5. Recherche des salmonelles

L'analyse microbiologique pour la recherche de *salmonella* spp. dans les plats cuisinés a été réalisée selon la méthode décrite dans la norme ISO 6579 (**Annexe IX**). Elle nécessite 4 étapes (**ISO 6579, 2002**) :

II.2.2.5.1. Pré-enrichissement

Une quantité de 25 g de l'échantillon à analyser est diluée dans un volume de 225 ml d'EPT, la suspension mère est broyée à l'aide d'un Stomacher pendant 1 min puis incubée à 37°C pendant 24h.

II.2.2.5.2. Enrichissement

Un volume de 1 ml de la culture de pré-enrichissement estensemencé dans un bouillon au sélénite acide de sodium et cystéine (SFB S/C), contenant un disque de sélénite acide de sodium (additif SFB), et incubé à 37°C pendant 24h.

II.2.2.5.3. Isolement

A partir de l'enrichissement un isolement est effectué sur gélose Hektoen, les boîtes de pétri sont incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24h. Après incubation, on examine les boîtes afin de rechercher la présence des colonies caractéristiques des salmonelles. Les colonies suspectes de *salmonella* spp. Sur gélose Hektoen sont de couleur de milieu (lactose négatif) avec ou sans centre noir. Les colonies a centre noir sont H₂S (+) et n'utilisent aucun des glucides du milieu.

II.2.2.5.4. Identification biochimique des salmonelles

II.2.2.5.4.1. Ensemencement sur gélose TSI

A partir d'une colonie suspecte sur milieu Hektoen, on ensemence la pente du milieu TSI en stries et le culot par piqure centrale, l'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Les caractéristiques des souches *Salmonella* spp. sur gélose TSI correspondent à :

- Une pente alcaline (rouge) : Lactose et Saccharose (-)
- Un culot acide (jaune) : Glucose (+)
- Formation de gaz (bulle) et formation de sulfure d'hydrogène (noircissement de la gélose).

II.2.3. Evaluation des performances d'un spectromètre MALDI-TOF-MS Microflex LT dans l'identification bactérienne des souches recherchées

Les souches isolées à partir des plats cuisinés et identifiées sur la base de tests biochimiques, ont été identifiées par le spectromètre MALDI-TOF-MS Microflex LT, équipé du logiciel et base de données Biotyper 4.0. La préparation des échantillons pour l'analyse par MALDI-TOF-MS a été réalisée comme suit (**Figure 8**).

A l'aide d'un cure-dent stérile, on dépose directement sur les spots de la cible, sous la forme d'un fin frottis, les colonies pure de chaque bactérie isolée (*L.monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*) à partir de milieux de culture sélectif (*chromogenic listéria agar*, Baird Parker, *E.coli Coliforms Chromogenic medium*) respectivement. Ensuite, les colonies déposées sur la cible sont recouvertes par 1µl de l'acide formique. Après, tous les spots sont recouverts par 1µl de la solution de matrice HCCA. Après séchage à une température ambiante, La cible est introduite dans le spectromètre MALDI-TOF-MS. Un témoin négatif (Matrice HCCA), un témoin positif du fonctionnement du test (1µl de BTS) et une souche de référence de chaque

espèce bactérienne sont inclus dans chaque essai. Trois essais ont été réalisés pour chaque souche bactérienne.

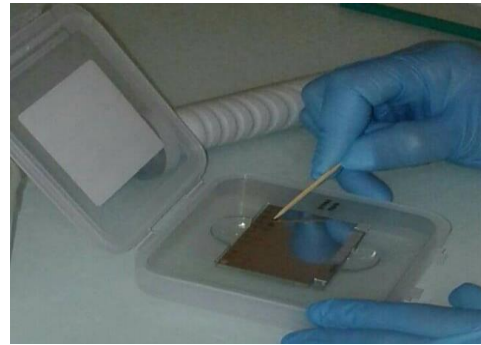
Après introduction de la cible dans le système, elle est bombardée par un laser. Les ions ainsi générés dans la chambre d'ionisation sont accélérés dans un champ électrique qui les dirige dans un tube de vol vers l'analyseur. Ce dernier permet de séparer et de classer les ions accélérés selon leur temps de vol (TOF) et de produire un spectre de masse. Le spectre de masse obtenu est une sorte d'empreinte digitale spécifique et unique de la composition en protéines du microorganisme analysé, qui peut être comparé à une banque de données de spectres. La fiabilité de la comparaison est déterminée à l'aide d'un score. Le **tableau VII**, explique la signification de ces scores :

Tableau VII : Signification des scores obtenus par MALDI-TOF-MS.

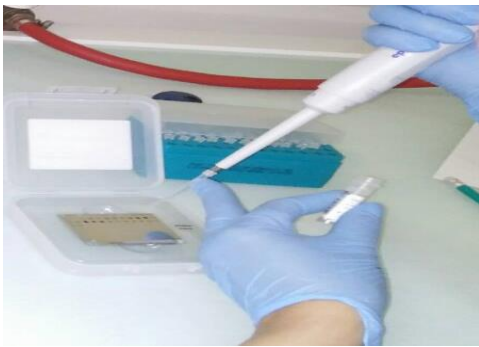
| Score | Description |
|---------------------|--|
| 2.300 -3.000 | Très bonne identification de l'espèce |
| 2.000-2.999 | Bonne identification au stade genre, identification probable au stade espèce |
| 1.700- 1.999 | Identification probable au stade genre |
| 0.000-1.699 | L'identification n'est pas possible |



1-Selection d'une colonie d'intérêt.



2- Réalisation d'un fin frottis de la colonie à l'aide d'un cure-dent.



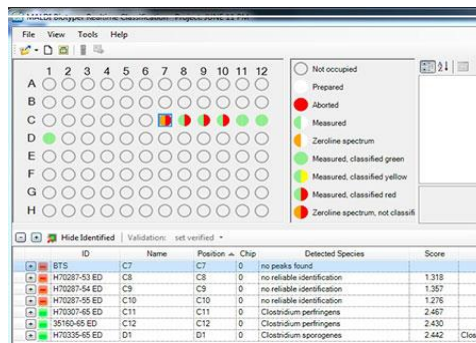
3- 1µL de l'acide formique. + 1µL HCCA.



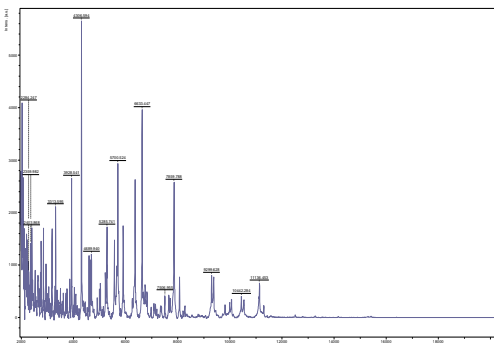
4- Séchage de la cible à une température ambiante.



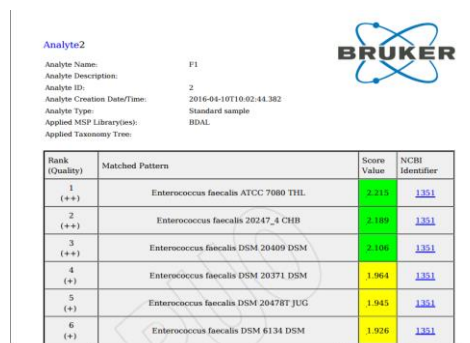
5-Insertion de la cible dans la chambre de l'automate.



6-Créer une liste sur le logiciel.



7- Le logiciel va automatiquement générer un spectre de masse.



8 - Le spectre se met instantanément en correspondance avec la bibliothèque.

Figure 8 : Protocol de l'Analyse par MALDI-TOF-MS Biotyper4.0.

Résultats et Discussion

III.1. Résultats

Dans ce travail nous avons recherché quatre espèces impliquées dans les TIA, à savoir : *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *salmonella* spp, dans les plats cuisinés à base de la viande et à base de légumes, par l'utilisation des méthodes conventionnelles et le spectromètre MALDI-TOF-MS.

III.1.1. Résultats de la recherche de *L. monocytogenes*

La recherche de *L. monocytogenes* a été réalisée selon la méthode ISO 11290-1 et le mode opératoire interne de laboratoire, la première étape était l'enrichissement sur un bouillon Fraser, c'est une phase importante car les souches *Listeria* sont en général en petit nombre dans les aliments et sont accompagnées d'une flore associée abondante. La croissance bactérienne se traduit par l'apparition de trouble après 24h à 48h d'incubation à 30 °C (**Figure 9**). Après enrichissement, l'isolement des souches *Listeria* présentes dans les plats cuisinés a été réalisé en utilisant un milieu sélectif, le *Chromogenic Listeria Agar* (OCLA- ISO). Sur ce milieu, les souches *L. monocytogenes* sont différenciées par leur aptitude à produire deux enzymes de type phospholipase, qui hydrolysent le phosphatidylinositol et la léthicine dans le milieu, produisant un halo blanc opaque autour de la colonie (**Figure 10**). La présence de ces enzymes phospholipasique est aussi un indicateur utile de la pathogénicité.

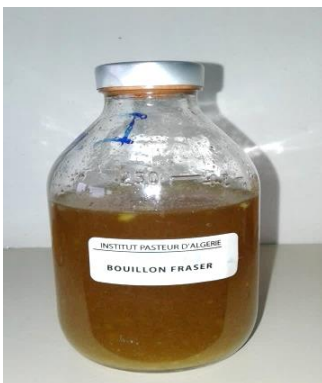


Figure 9 : Aspect de bouillon Fraser après 24h d'incubation.



Figure 10 : Aspect des colonies de la souche *L. monocytogenes* LMPC55 sur milieu OCLA.

Six (06) souches présentant les caractéristiques phénotypiques de l'espèce *L. monocytogenes* ont été isolées, à partir des plats cuisinés, en utilisant le milieu *Chromogenic Listeria Agar* (OCLA-ISO). Ces souches étaient Gram positif (**Figure 11**), catalase + et oxydase –.

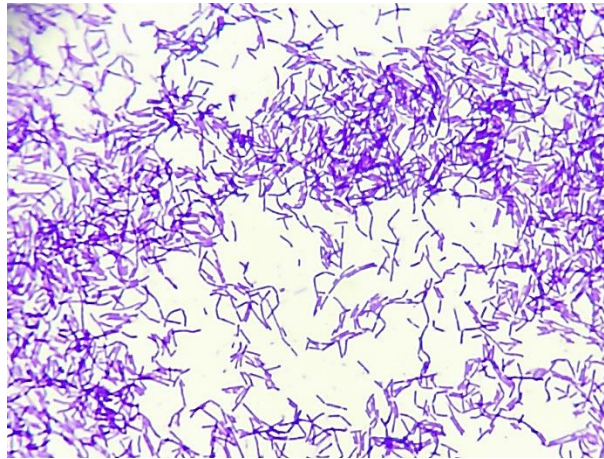


Figure 11 : Observation microscopique après coloration de Gram de la souche *L. monocytogenes* LMPC55 (Grossissement x 1000).

Les souches de l'espèce *L. monocytogenes* sont aussi caractérisées par une hémolyse de type β . C'est le but d'ensemencement en stries sur gélose au sang de cheval à 7%, dans laquelle l'activité hémolytique apparaît sous forme d'une zone d'hémolyse périphérique légère autour des colonies bactériennes (**Figure 12**). Les six souches présumées comme étant *L. monocytogenes* possèdent une activité hémolytique de type β .



Figure 12 : Test d'hémolyse de la souche *L. monocytogenes* LMPC55 sur gélose au sang à 7%.

Après 24 heures d'incubation, une identification plus précise est réalisée à l'aide de la galerie API *Listeria*, basée sur 10 tests. A l'aide de ce système, nous avons confirmés l'appartenance des six (06) souches présumées, à l'espèce *L. monocytogenes* (**Annexe V**). La **figure 13**, montre le résultat d'une galerie API *Listeria*, pour la souche *L. monocytogenes* LMPC55. Le test clé dans la différenciation de l'espèce *L. monocytogenes* des autres espèces du genre est le test DIM, qui inclut la recherche d'une aminopeptidase particulière absente chez *L. monocytogenes*.

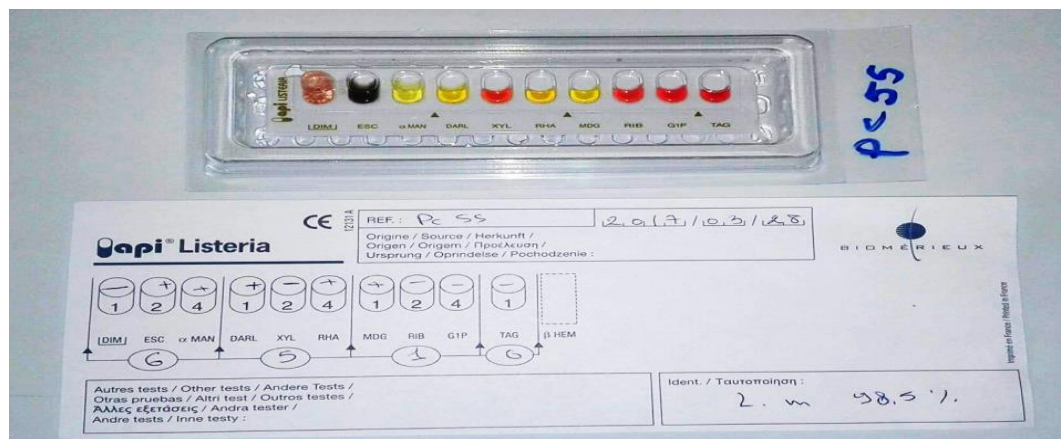


Figure 13 : Résultats d'identification biochimique de *L. monocytogenes* LMPC55 sur galerie API *Listeria*.

L'identification en se basant sur l'approche protéomique, a été réalisée par l'utilisation d'un spectromètre MALDI-TOF-MS, équipé du logiciel et base de données Biotyper 4.0. Un exemple de spectre de masse obtenu pour la souche *L. monocytogenes* LMPC55 est montré dans la **figure 14**. Les résultats montrent que toutes les souches appartenaient à l'espèce *L. monocytogenes* (**Tableau VIII**). Cette identification est à 100% comparable à l'identification obtenue par l'utilisation de la galerie API *Listeria*. Ceci signifie que la base de données était capable de reconnaître l'espèce *L. monocytogenes* avec des scores satisfaisants (supérieur à 2) (**Figure 15**).

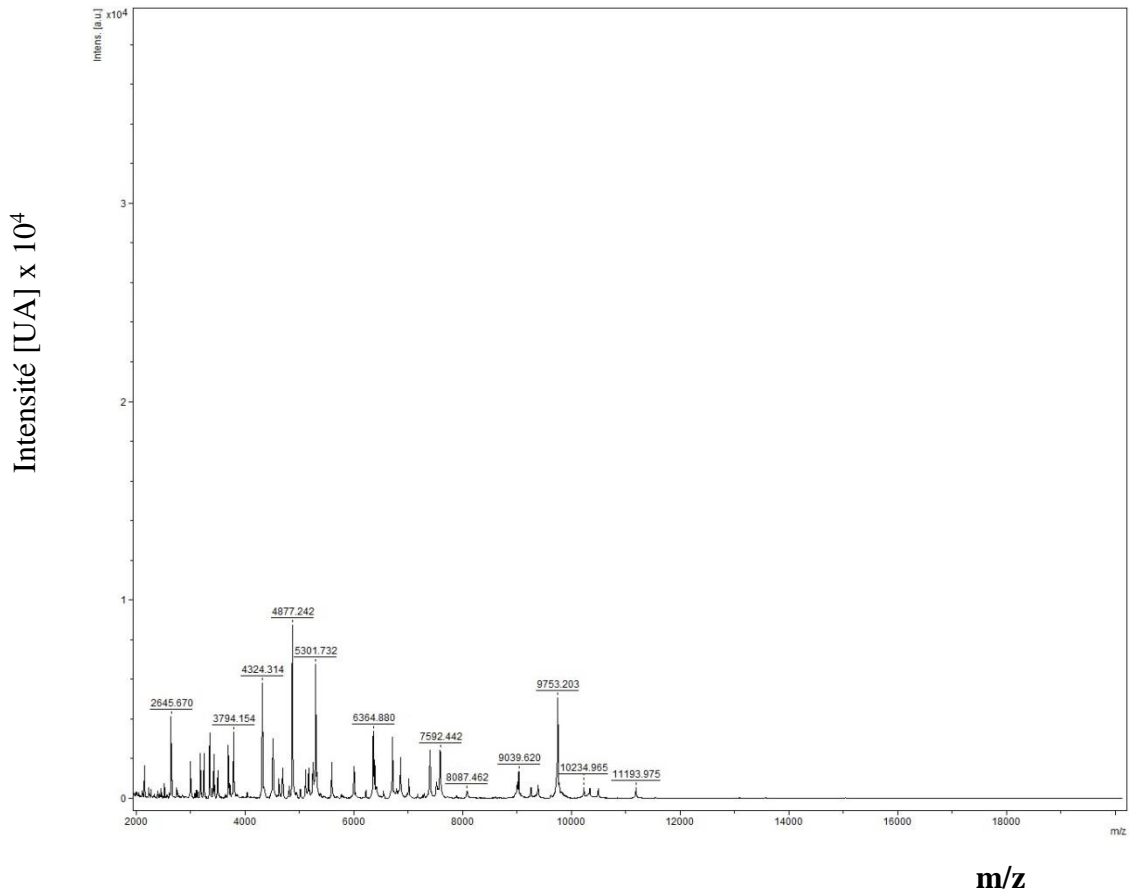


Figure14 : Spectre MALDI-TOF-MS de la souche *L. monocytogenes* LMPC55.

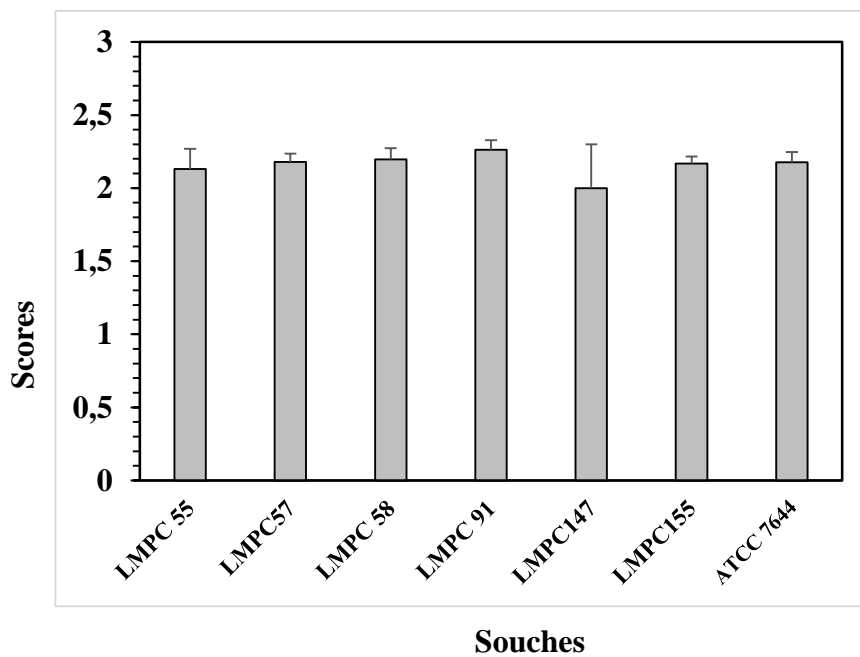


Figure 15 : Scores d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce *L. monocytogenes*.

Tableau VIII : Caractéristiques et identification des souches *L. monocytogenes* isolées à partir des plats cuisinés.

| Souches | Forme | Coloration de Gram | Catalase | Oxydase | L'activité hémolytique sur gélose au sang | Test DIM* | Identification par API <i>Listeria</i> | Identification par MALDI-TOF-MS** | Score d'identification par MALDI-TOF-MS |
|-----------|----------|--------------------|----------|---------|---|-----------|--|-----------------------------------|---|
| LMPC 55 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.130 ± 0.139 |
| LMPC57 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.180 ± 0.056 |
| LMPC 58 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.197 ± 0.077 |
| LMPC 91 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.263 ± 0.066 |
| LMPC147 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.000 ± 0.300 |
| LMPC155 | Bâtonnet | + | - | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.168 ± 0.049 |
| ATCC 7644 | Bâtonnet | + | + | - | + | - | <i>Listeria monocytogenes</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 2.178 ± 0.070 |

(*)Test de différenciation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes* sur API *Listeria*

(**) Culture réalisée sur milieu OCLA, pendant 24h à 35°C.

III.1.2. Résultats de la recherche de *S. aureus*

L'analyse microbiologique pour la recherche de *S. aureus* dans les plats cuisinés a été faite selon la méthode ISO 6888-1. Après enrichissement sur bouillon TSE (**Figure 16**), un ensemencement est réalisé sur milieu Baird Parker. Les colonies présentant la forme caractéristiques de *S. aureus* après 24 h d'incubation à 37 °C (noires ou grises, brillantes et convexes et entourées d'une auréole d'éclaircissement) ont été retenues. La **figure 17** montre les résultats obtenus après ensemencement sur gélose Baird Parker au jaune d'œuf. Ensuite, les colonies caractéristiques ont été purifiées sur gélose Chapman, pour identifier les souches mannitol positive (**Figure 18**).



Figure 16 : Enrichissement dans un bouillon TSE.

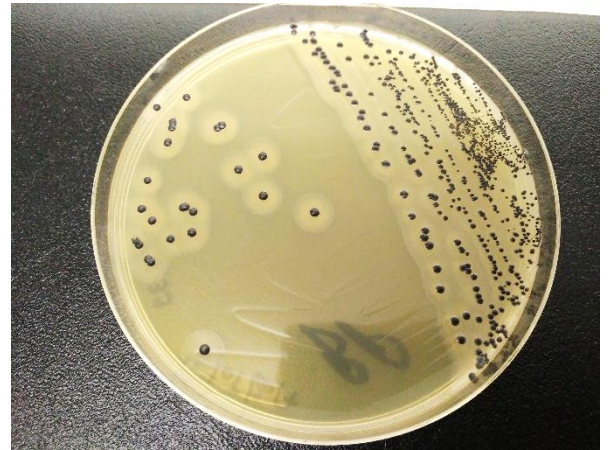


Figure17 : Colonies caractéristiques obtenues après ensemencement sur Gélose Baird Parker.

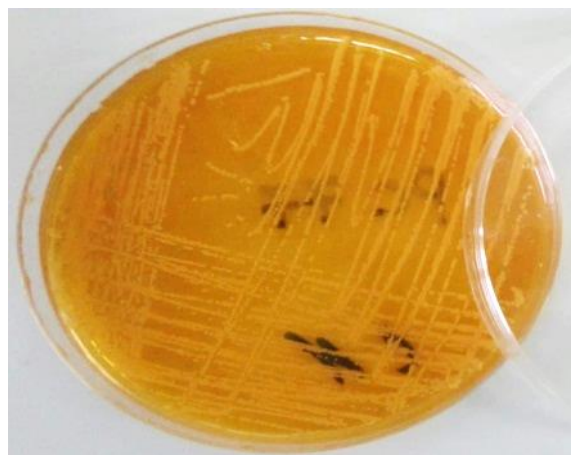


Figure18 : Purification sur gélose Chapman.

Trois (03) souches présentant les caractéristiques de *S. aureus* sur gélose Chapman ont été retenues. Ces souches étaient toutes des cocci à Gram positif (**Figure 19**), oxydase négatif, catalase positive coagulase positive (**figure 20**).

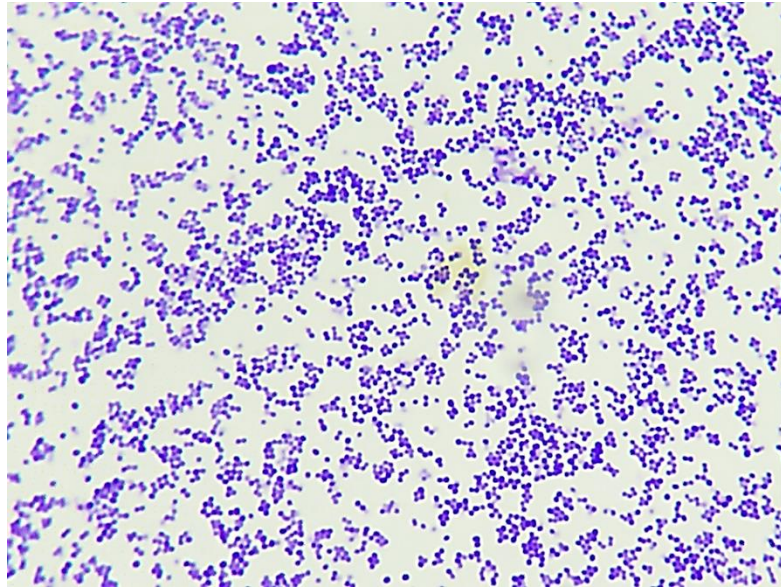


Figure 19 : Observation microscopique après coloration de Gram de la souche STPC 29 (Grossissement x 1000).



Figure 20 : Test coagulase de la souche STPC 29.

L'identification par le spectromètre MALDI-TOF-MS, a confirmé l'appartenance de ces souches à l'espèce *S. aureus* (**Tableau IX**), avec des scores acceptables (**figure 22**). Un exemple de spectre de la souche *S. aureus* STPC 29 est montré dans la **figure 21**.

Tableau IX : Caractéristiques et identification des souches *S. aureus* isolées à partir des plats cuisinés.

| Souches | Forme de Gram | Coloration | Catalase | Oxydase | Coagulase | Identification par MALDI-TOF-MS* | Score d'identification |
|-------------------|---------------|------------|----------|---------|-----------|----------------------------------|------------------------|
| STPC 29 | Cocci | + | + | - | + | <i>S. aureus</i> | 2.151 |
| STPC 33 | Cocci | + | + | - | + | <i>S. aureus</i> | 2.303 |
| STPC 38 | Cocci | + | + | - | + | <i>S. aureus</i> | 1.957 ± 0.105 |
| ATCC 25923 | Cocci | + | + | - | + | <i>S. aureus</i> | 2.247 ± 0.044 |

(*) Culture réalisée sur milieu Baird parker, pendant 24h à 35°C.

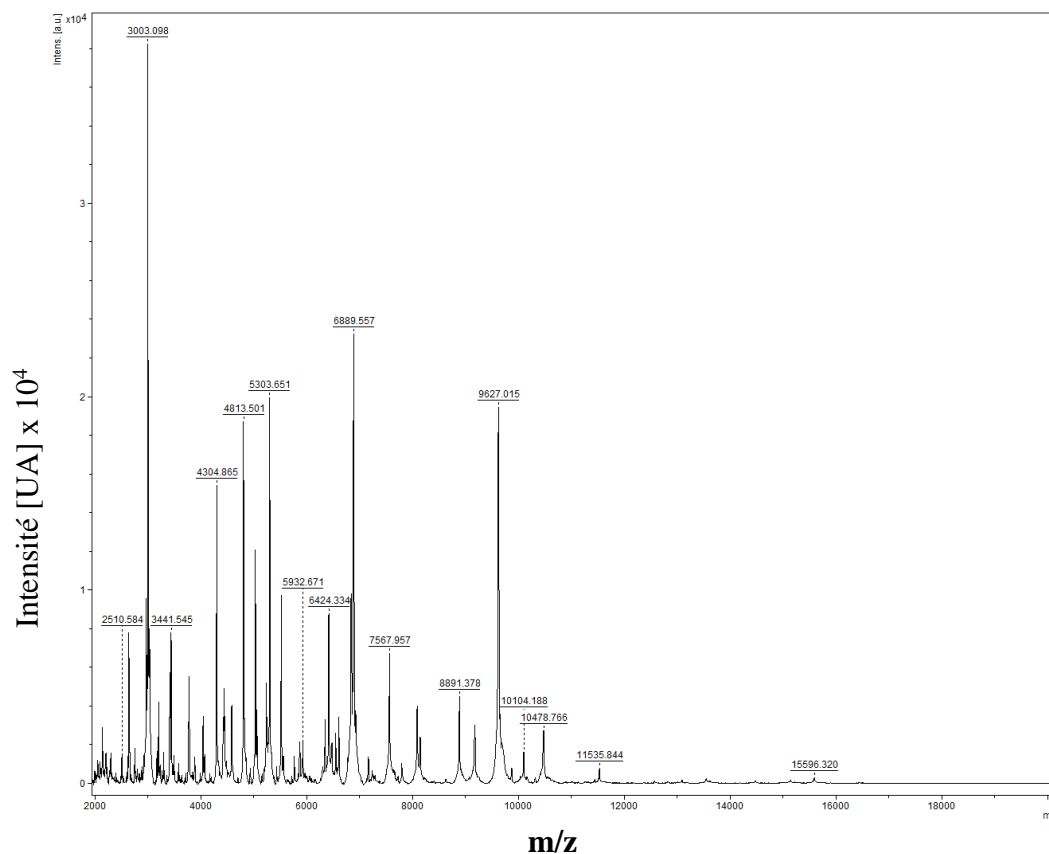


Figure 21 : Spectre MALDI-TOF-MS de la souche *S. aureus* STPC 29.

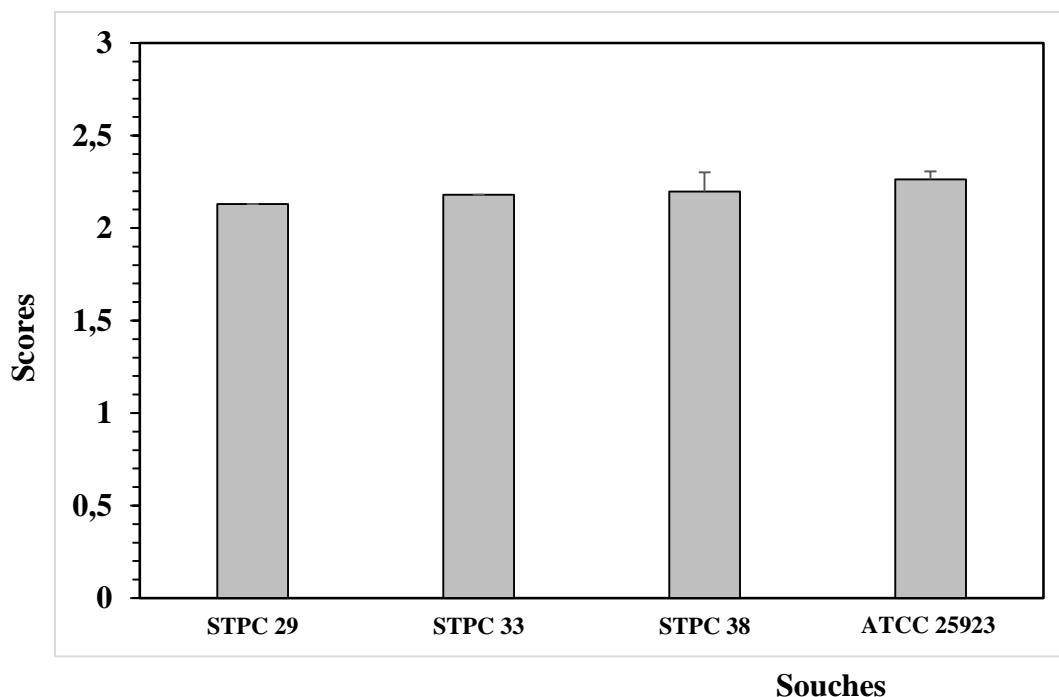


Figure 22 : Scores d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce *S. aureus*.

III.1.3. Résultats de la recherche de *E. coli*

La recherche des souches appartenant à l'espèce *E. coli* dans les plats cuisinés a été faite selon la méthode ISO 16649-1. Après enrichissement sur bouillon TSE, l'ensemencement a été réalisé sur milieu TBX. Sur ce milieu, les colonies suspectes d'appartenir à l'espèce de *E. coli* sont de couleur bleu vertes (**Figure 23**). Ces colonies ont été après purifiées sur milieu sélectif *E.coli Coliforms Chromogenic medium*, qui est un milieu sélectif pour la détection de *E. coli* et d'autres coliformes dans les eaux et les aliments. Sur ce milieu les colonies de *E. coli* possédant la β -D-galactosidase et la glucuronidase, se distinguent des autres coliformes par la couleur bleu foncée (**Figure 24**).

Trois souches, présentant les caractéristiques morphologiques de l'espèce *E. coli* ont été retenues. Ces souches étaient sous forme de bâtonnets à Gram négatif (**Figure 25**), catalase positive et oxydase négatif.

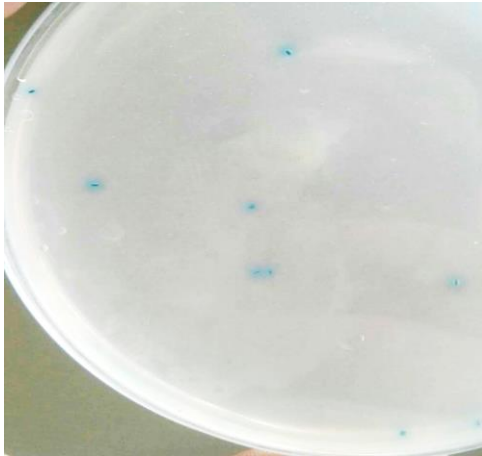


Figure 23 : Souches suspectent d'appartenir à l'espèce *E. coli* sur milieu TBX.

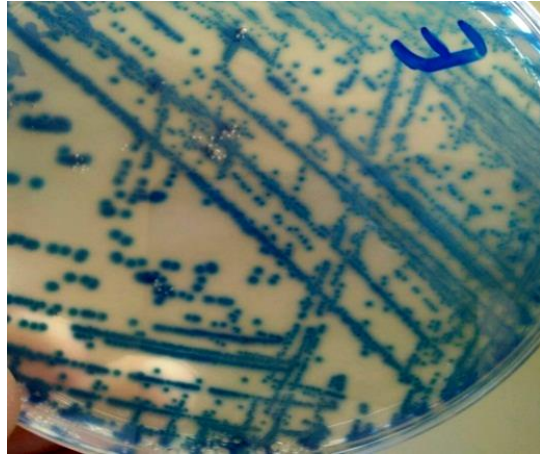


Figure 24 : Purification d'une souche *E. coli* sur milieu *E.coli Coliforms Chromogenic medium*.

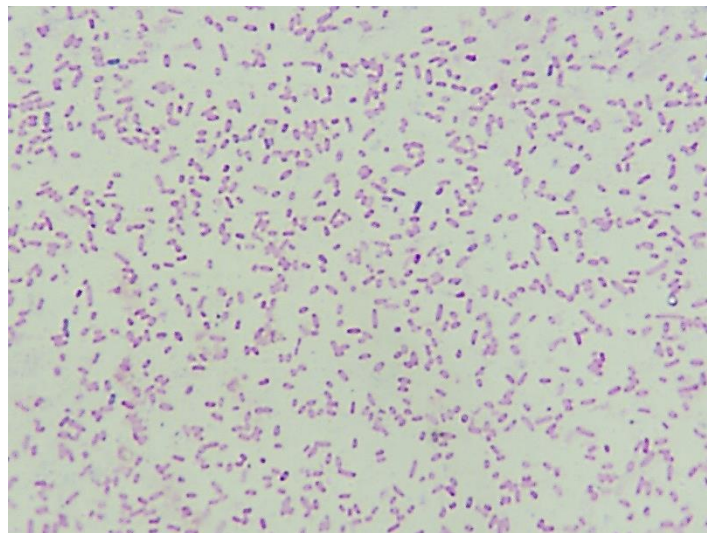


Figure 25 : Observation microscopique après coloration de Gram de la souche ECPC 57 (Grossissement x 1000).

L'appartenance des souches à l'espèce *E. coli* a été vérifiée par l'identification biochimique à l'aide de la galerie API 20 E (**Figure 26**) et (**Annexe VI**). L'identification par le spectromètre MALDI-TOF-MS, a confirmé l'appartenance de ces souches à l'espèce *E. coli* (**Tableau X**). Un exemple de spectre de la souche *E. coli* ECPC 74 est montré dans la **figure 27**.

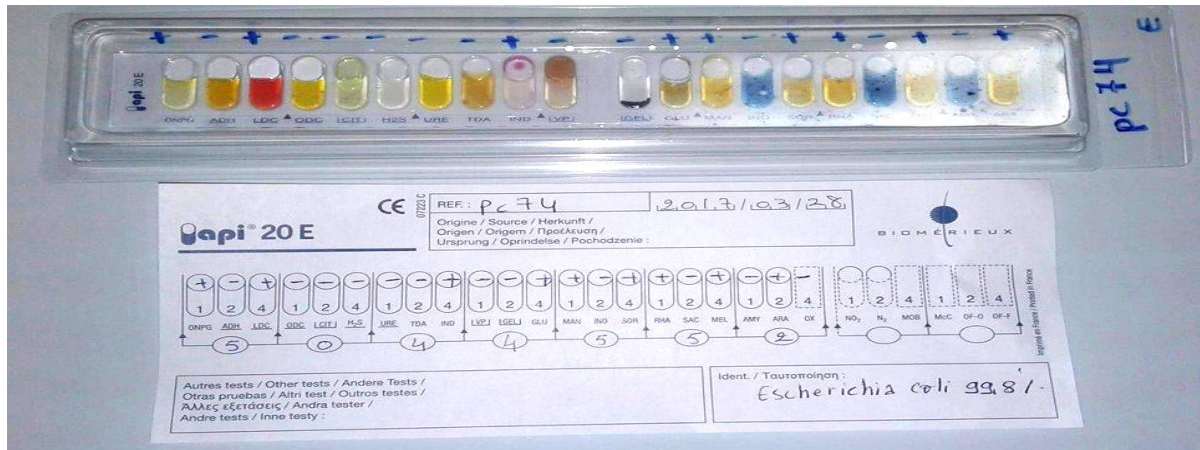


Figure 26 : Résultats d'identification biochimique de *E. coli* ECPC 74 sur galerie API 20E.

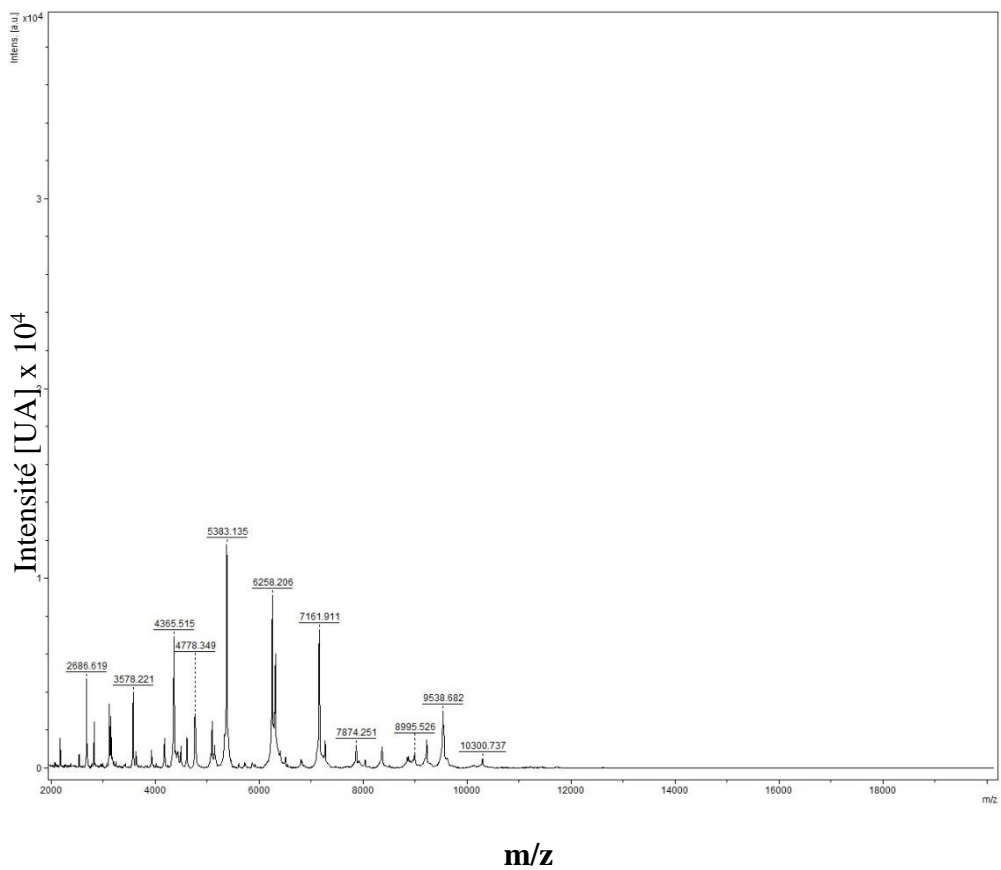


Figure 27 : Spectre MALDI-TOF-MS de la souche *E. coli* ECPC 74.

Tableau X : Caractéristiques et identification des souches *E. coli* isolées à partir des plats cuisinés.

| Souches | Forme | Coloration de Gram | Catalase | Oxydase | Identification par API 20E | Identification par MALDI-TOF-MS* | Score d'identification par MALDI-TOF-MS |
|-------------------|----------|--------------------|----------|---------|----------------------------|----------------------------------|---|
| ECPC 57 | Bâtonnet | - | + | - | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | 2.28 ± 0.062 |
| ECPC 74 | Bâtonnet | - | + | - | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | 1.933 |
| ECPC 90 | Bâtonnet | - | + | - | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | 2.020 |
| ATCC 25922 | Bâtonnet | - | + | - | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia coli</i> | 2.345 ± 0.098 |

(*) Culture réalisée sur milieu *E.coli Coliforms Chromogenic medium*, pendant 24h à 35°C.

L'identification par le spectromètre MALDI-TOF-MS des souches à *E. coli* présent dans les plats cuisinés était avec des scores satisfaisants **Tableau X** et **Figure 28**.

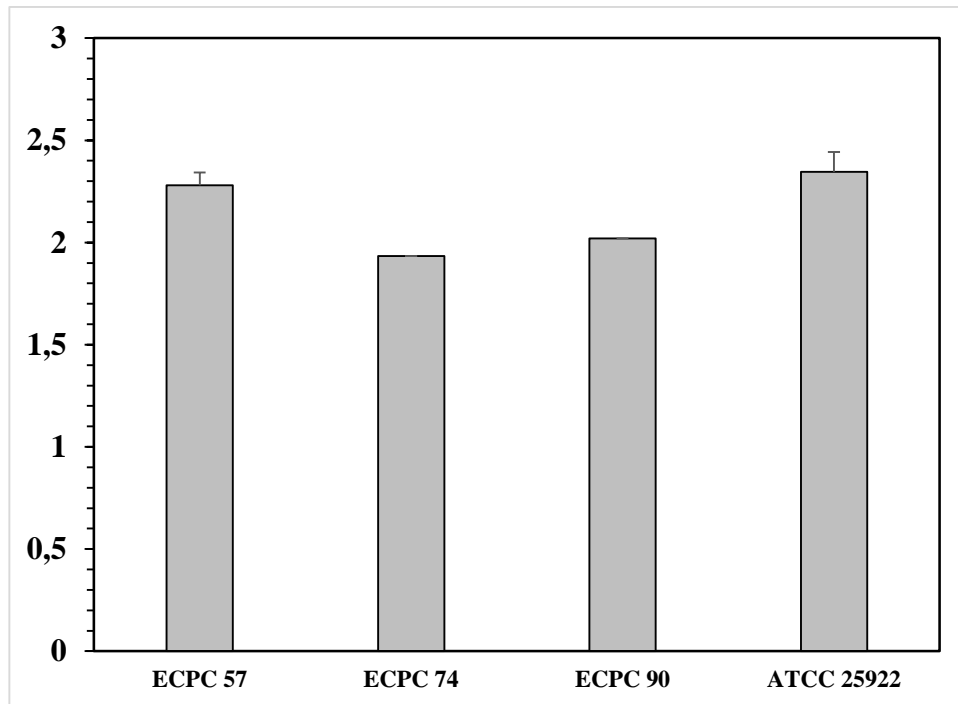


Figure 28 : Scores d'identification par MALDI-TOF-MS des souches appartenant à l'espèce *E. coli*.

III.1.4. Résultats de la recherche de *Salmonella* spp.

Dans ce travail, la recherche de *salmonella* spp. dans les plats cuisinés a été réalisée selon la méthode décrite dans la norme ISO 6579. Malgré le pré-enrichissement et l'enrichissement dans les bouillons EPT et SFB S/C respectivement, les colonies suspectes de *Salmonella* spp. isolées à partir de milieu Hecktoen n'ont pas été identifiées sur milieu TSI ce qui indique l'absence totale de *salmonella* spp. dans les plats cuisinés.

III.1.4. Qualité microbiologique des plats cuisinés

La qualité microbiologique des plats cuisinés a été estimée par la présence ou absence de l'un des germes recherchés dans cette étude. Les **tableaux XI** et **XII** montrent la présence ou l'absence de ces germes impliqués dans les TIA dans les 51 plats collectés.

Tableau XI : Présence / absence des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés à base de viande.

| Code des plats | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
|----------------|-------------------------|------------------|----------------|------------------------|
| PC 30 | - | - | - | - |
| PC31 | - | - | - | - |
| PC33 | - | + | - | - |
| PC37 | - | - | - | - |
| PC38 | - | + | - | - |
| PC 39 | - | - | - | - |
| PC40 | - | - | - | - |
| PC41 | - | - | - | - |
| PC42 | - | - | - | - |
| PC44 | - | - | - | - |
| PC56 | - | - | - | - |
| PC 59 | - | - | - | - |
| PC63 | - | - | - | - |
| PC75 | - | - | - | - |
| PC76 | - | - | - | - |
| PC77 | - | - | - | - |
| PC85 | - | - | - | - |
| PC88 | - | - | - | - |
| PC90 | - | - | + | - |
| PC94 | - | - | - | - |
| PC147 | + | - | - | - |
| PC148 | - | - | - | - |
| PC152 | - | - | - | - |
| PC155 | + | - | - | - |

(+) Présence (-) Absence

Tableau XII : Présence / absence des germes impliquées dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés à base de de légume.

| Code des plats | <i>L. monocytogenes</i> | <i>S. aureus</i> | <i>E. coli</i> | <i>Salmonella spp.</i> |
|----------------|-------------------------|------------------|----------------|------------------------|
| PC 29 | - | + | - | - |
| PC 32 | - | - | - | - |
| PC 34 | - | - | - | - |
| PC 35 | - | - | - | - |
| PC 36 | - | - | - | - |
| PC 43 | - | - | - | - |
| PC 55 | + | - | - | - |
| PC 57 | + | - | + | - |
| PC 58 | + | - | - | - |
| PC 60 | - | - | - | - |
| PC 64 | - | - | - | - |
| PC 73 | - | - | - | - |
| PC 74 | - | - | + | - |
| PC 78 | - | - | - | - |
| PC 79 | - | - | - | - |
| PC 84 | - | - | - | - |
| PC 86 | - | - | - | - |
| PC 87 | - | - | - | - |
| PC 89 | - | - | - | - |
| PC 91 | + | - | - | - |
| PC 92 | - | - | - | - |
| PC 93 | - | - | - | - |
| PC 114 | - | - | - | - |
| PC 115 | - | - | - | - |
| PC149 | - | - | - | - |
| PC151 | - | - | - | - |
| PC154 | - | - | - | - |

(+) **Présence** (-) Absence

Onze (11) plats cuisinés collectés contenaient au moins un germe pathogène, soit un pourcentage de 21.56 % des plats collectés (**Figure 29**). 05 plats étaient contaminés par *L. monocytogenes*, 03 plats par *S. aureus*, 02 plats par *E. coli* et un plats présentait une contamination mixte par *L. monocytogenes* et *E. coli* (**figure 30**). Alors que *Salmonella spp* n'a pas été détectée dans les plats collectés.

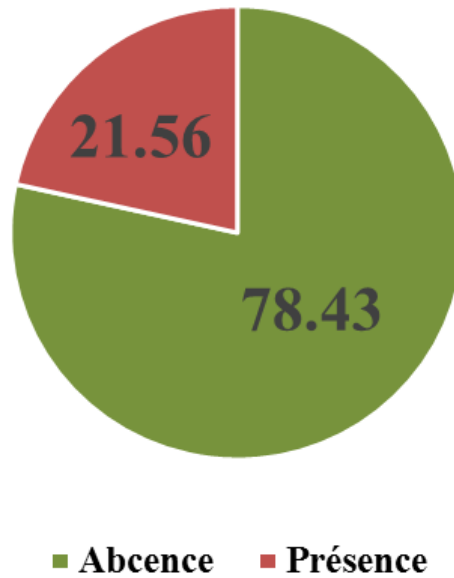


Figure 29 : Pourcentage de présence/absence des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires dans les plats cuisinés.

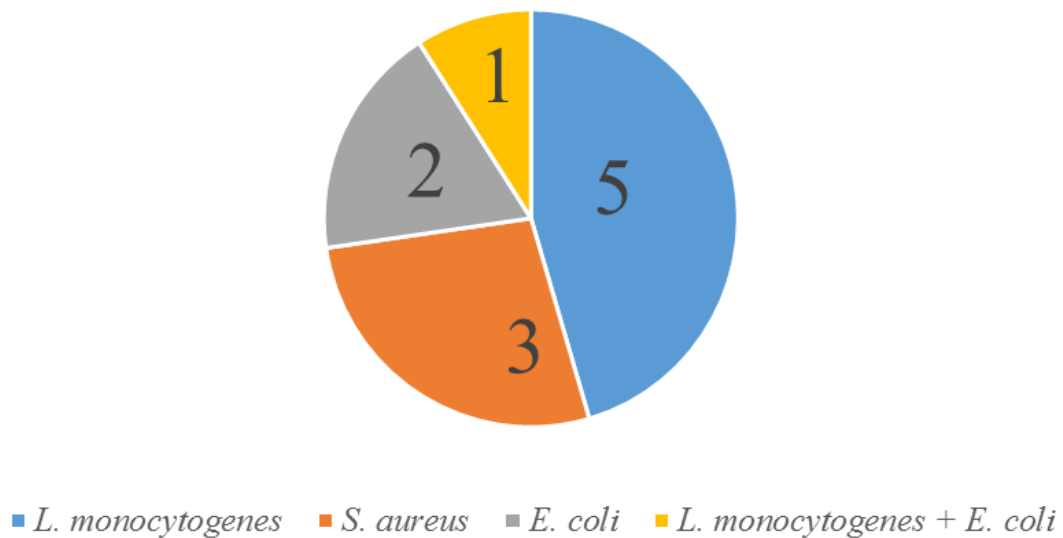


Figure 30 : Nombre des plats contaminés par les germes impliqués dans les toxi-infections alimentaire, par espèce.

III.2. Discussion

La qualité microbiologique des plats cuisinés a été estimée par la présence ou absence de l'un des germes recherchés, dans cette étude l'analyse microbiologique de 51 plats cuisinés a révélé la présence de trois germes (*L. monocytogenes*, *S. aureus* et *E. coli*) dans 11 plats collectés, avec un pourcentage de 21.56%. On note également l'absence des salmonelles.

Sur un total de 51 échantillons *L. monocytogenes* a été trouvée dans 06 plats cuisinés, avec un pourcentage de 11.76%. Ces résultats reflètent un taux plus élevé que celui trouvé par **Bouayed et Hamdi (2012)**, sur les produits prêts à la consommation dans la région d'Alger les auteurs ont observés une présence de 06 cas de *L. monocytogenes* sur un totale de 227 avec 2.6%. Dans une autre étude. **Christison et al., (2008)**, ont révélé une incidence de *L. monocytogenes* de 4% dans les produits prêt à manger sur un total de 648 échantillons collectés à Johannesburg, Afrique du Sud. Ces différences des taux d'incidences, pourrait être dû à la contamination croisée, l'inactivation de *L. monocytogenes* pendant le traitement thermique, elle peut se propager dans toute l'installation en raison de matériaux de contact contaminés et les mauvaises pratiques d'hygiène dans la préparation des aliments (**Goh et al., 2014 ; Muhterem-Uyar et al., 2015**).

Les résultats obtenus dans cette étude, montrent que la recherche *L. monocytogenes* est importante pour la catégorie des plats cuisinés. Ce qui recommande aux autorités Algériennes, l'addition de cette espèce à la liste des espèces citées dans JOA N°35 du 27 mai 1998 (**JOA, 1998 ; Jadhav et al., 2014**).

L'utilisation de la gélose chromogène OCLA sélectif pour *Listéria* pathogène nous a facilité la détection économique et rapide de *L. monocytogenes* dans les plats cuisinés au bout de 24h d'incubation à 37°C. Ces résultats sont en accord avec la description de **Reissbrodt, (2004)**. De même, Il est à noter que des souches de *L. ivanovii* peuvent présenter des colonies caractéristiques de tailles néanmoins plus réduites que *L. monocytogenes*. En raison de cette ressemblance, *L. ivanovii* peut être distingué de *L. monocytogenes* par le test d'hémolyse de type β observé sur gélose au sang à 7%.

La galerie API *Listéria* est la méthode biochimique la plus utilisée en routine pour différencier les espèces de *Listéria*. Dans notre étude, cette galerie a permis une bonne identification de

L. monocytogenes avec un pourcentage de 98.5%. Le test clé dans la différenciation de cette espèce des autres est le test DIM (Setiani et al., 2015).

Cette identification biochimique de *L. monocytogenes* est comparable à l'identification obtenue par l'utilisation de MALDI-TOF-MS. C'est-à-dire la base de données était capable de reconnaître l'espèce *L. monocytogenes* directement à partir du milieu chromogène OCLA avec des scores satisfaisants (supérieur à 2). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Barbuddhe et al., (2008) ; Ojima-Kato et al., (2016) qui ont montré la capacité de la spectroscopie MALDI-TOF-MS dans l'identification des souches *L. monocytogenes*.

Les plats cuisinés peuvent représenter un milieu favorable pour la croissance de *S. aureus*, trois plats cuisinés étaient contaminés avec un pourcentage de 5.8 % sur un totale de 51 échantillons. Selon une étude récente en Algérie de Hamiroune et al., (2017) montre que 83.3% de Merguez sont de mauvaise qualité microbiologique due à la charge de staphylocoques à coagulase positif.

Delmas et al., (2010) ont confirmé que parmi les TIAC dues à l'entérotoxine staphylococcique, la consommation des plats cuisinés a été très fréquemment retrouvée. Dans notre étude la présence de *S. aureus* était élevée dans les plats cuisinés à base de viandes que celle dans les plats à base de légumes. Ces résultats sont en accord avec ceux qui sont rapportés par Haeghebaert et al., (2002) qui ont montrés que aux États-Unis, 36% des intoxications alimentaires staphylococciques sont attribuables à la viande et 12,3% aux salades. Ces différences en matière de taux d'incidence peuvent être dues à la qualité hygiénique de la matière première utilisée, les conditions de préparation des plats et les habitudes alimentaires dans chacun des pays (Haeghebaert et al., 2002 ; Le Loir et al., 2003 ; Salihu et al., 2010).

Les colonies présentant les caractéristiques morphologiques de *S. aureus* sur le milieu Baird Parker, ont subi le test coagulase pour la détermination des souches à coagulase positif, et ceci après 24h d'incubation. Par contre, les résultats obtenus par l'identification MALDI-TOF-MS ont confirmé l'appartenance de ces souches à l'espèce *S. aureus* directement à partir du milieu Baird Parker, avec des scores acceptables dans un délai plus court. En 2015, Zhu et al ont rapporté que l'identification des espèces du genre *Staphylococcus* par MALDI-TOF-MS peut être une bonne alternative à l'utilisation des méthodes classiques.

L'espèce *E. coli* a été trouvée dans 03 plats cuisinés (02 salades variées et 01 plat à base de viande), avec un pourcentage de 5.8%. Jiang et al., (2014) ont détecté la présence de *E coli*,

avec un pourcentage de 12.1%, dans des viandes cuites collectés à Henan en Chine. De même, **Shakerian et al., (2016)** ont indiqué la présence de *E. coli* dans 49% des salades. Les colonies de *E. coli* obtenus sur le milieu sélectif TBX apparaissent en couleur bleu, ce qui indique la présence de la β glucuronidase après 24h d'incubation. **Verhaegen et al., (2015)** ont confirmés que ce milieu est conçu pour la détection de *E. coli*. De même, l'utilisation de milieu chromogénique *E.coli Coliforms Chromogenic medium* pour la détermination des souches *E. coli* est aussi recommandé (**González et al., 2003**). L'identification biochimique des souches a été réalisée par l'utilisation d'une galerie API 20E. Nos résultats montrent une bonne identification des souches *E. coli* avec un pourcentage de 99.8%, après 24h d'incubation. Au même temps, la base de données de MALDI-TOF-MS était capable de reconnaître l'espèce *E. coli* directement à partir du milieu chromogénique avec des scores satisfaisants. Ces résultats sont en accord avec les travaux des **Grevskott et al., (2016)** qui ont montré la capacité du MALDI TOF-MS dans l'identification de ces souches *E. coli*.

Le journal officiel algérien JOA N°35 du 27 mai 1998 exige l'absence totale de *Salmonella* spp. dans les plats cuisinés. Nos résultats de la recherche de ce genre bactérien étaient négatifs pour tous les plats collectés. Ces résultats sont semblables à ceux obtenues en Algérie, **Hamiroune et al.,(2017)** ont montrés l'absence de *Salmonella* spp dans des échantillons de Merguez collectés dans la région de Msila et par **Iboudo et al., (2009)** qui ont observé une absence totale de *Salmonella* spp. dans les repas à base de viande distribués dans des restaurants universitaires de Ouagadougou (Burkina Faso). Par contre, dans une autre étude réalisée en France, une forte prévalence de *Salmonella* spp. a été retrouvée pour la viande hachée et préparations à base de volaille destinée à être consommée cuite (8,7%) (**Guilbot et al., 2012**). L'absence de *Salmonella* spp. peut être due à leur inactivation par cuisson adéquate des plats cuisinés. **Doménech et al., (2015)** ont confirmés que *Salmonella* spp. ne résistent pas à la chaleur.

Conclusion

Conclusion

L'objectif de ce travail est la recherche de la présence des quatre souches bactériennes impliquées dans les toxi-infections alimentaires, à savoir : *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* et *Salmonella* spp. dans les plats cuisinés collectés à partir des restaurants et des cantines avec l'évaluation des performances de MALDI-TOF-MS dans leur identification.

Nous avons détecté la présence de ces germes dans 11 plats cuisinés sur un total de 51 plats collectés avec un pourcentage 21.56 %. Nos résultats montrent que *L. monocytogenes* est la plus fréquemment trouvées dans les plats collectés avec un pourcentage de 11.56% par rapport aux autres germes (*S. aureus* 5.8% et *E. coli* 5.8%), alors que *Salmonella* spp. était absente, dans la limite de la méthode utilisée.

Il est important de préciser que la contamination des plats cuisinés par des germes pathogènes, tel que *L. monocytogenes*, représente un réel danger pour la santé humaine. De ce fait, il est fortement recommandé que ce paramètre soit pris en compte par la réglementation Algérienne.

Les résultats d'identification bactérienne obtenus par le spectromètre MALDI-TOF-MS étaient à 100% comparables à ceux obtenues par les méthodes conventionnelles. Cette technologie présente l'avantage d'être rapide, fiable et reproductible. En plus, elle est bien adaptée à l'analyse à haut débit avec un faible coût de fonctionnement. De même, l'utilisation des milieux chromogéniques est une bonne approche pour l'isolement et l'identification rapide de certains germes pathogènes, comme c'est le cas de *L. monocytogenes* et *E. coli*.

En perspectives, une évaluation des performances de la technologie MALDI-TOF-MS dans l'identification des germes impliqués dans les toxi-infections alimentaires, sera réalisée sur d'autres denrées alimentaires et avec un nombre d'échantillons plus élevé. Ce qui va permettre la proposition de démarches analytiques rapides pour la recherche de ces germes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Akhtar S., Sarker M. R. & Hossain A., 2014.** Microbiological food safety: a dilemma of developing societies. *Critical reviews in microbiology*, 40, 348-359.
2. **Akpabio U., 2015.** Epidemiology of Poultry Salmonellosis: a Review. *J. Vet. Adv*, 5, 902-911.
3. **Akyala A. I. & Alsam S., 2015.** Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Strains of *Salmonella* species-A Systematic Review. *Journal of Microbiology Research*, 5, 57-70.
4. **AL Kassaai., EL Omari K., Saati M., Ismail B. & Hamze M. 2016.** prévalence de *listeria monocytogenes* dans le lait cru de vache au liban nord. *Lebanese Science Journal*, 17, 37.
5. **ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (France), 2011a.** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Listeria monocytogenes*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2011sa0117Fi.pdf>
6. **ANSES, Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (France), 2011b.** Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments / *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques.
7. **APS, Agence de Presse Algérienne., 2015.** intoxication alimentaire : 3.000 A 4.000 CAS enregistrés annuellement .<http://www.blida-aps.dz/spip.php?article14027>
8. **Argaw S. & Addis M., 2015.** A Review on Staphylococcal Food Poisoning. *Food Science and Quality Management*, 40.
9. **Avril J. L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 1992.** Bactériologie clinique, *Ed. Ellipses-Marketing*.
10. **Bacha P. D., 2015.** Gestion d'une Toxi-infection Alimentaire Collective en Milieu Militaire.
11. **Barbuddhe S. B., Maier T., Schwarz G., Kostrzewa M., Hof H., Domann E., Chakraborty T. & Hain T., 2008.** Rapid identification and typing of *listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 5402-5407.

12. **Bhatt B., Nagar G., Nagar S. & Tyagi N., 2016.** Food-borne Diseases and Techniques to Detect Food-borne Pathogens and Their Limitations. *International Journal*, 4, 199-205.
13. **Bouayad L. & Hamdi T. M., 2012.** Prevalence of *Listeria* spp. in ready to eat foods (RTE) from Algiers (Algeria). *Food Control*, 23, 397-399.
14. **Bourassa L. & Butler-Wu S. M., 2015.** MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Methods in Microbiology*, 42, 37-85.
15. **Bouvet J., & Vernozy-Rozand C., 2000.** Méthodes génétiques de détection des *Escherichia coli* vérotoxiques (STEC) et de *Escherichia coli* O157 : H7 dans les aliments. *Rev. Med. Vet.*, 151, 907-914.
16. **Buisson Y., Marie J. & Davoust B., 2008.** Ces maladies infectieuses importées par les aliments. *Bulletin de la Societies de Pathologies Exotique*, 101, 343.
17. **Camargo A. C., Woodward J. J. & Nero L. A., 2016.** The continuous challenge of characterizing the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *Food borne pathogens and disease*, 13, 405-416.
18. **Cassagne C., Ferret, A. L., Suchon, P., Normand, A. C., Michel-Nguyen, A., Ranque, S., & Piarroux, R., 2012.** Évaluation de quatre méthodes de prétraitement des échantillons de levures en vue de leur identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 22(3), 284
19. **Chaiba A. & Filali F. R., 2016.** Prévalence de la contamination par *Salmonella* des élevages de poulet de chair au Maroc. *Cahiers Agricultures*, 25, 35007.
20. **Christison C., Lindsay D. & Von Holy A., 2008.** Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19, 727-733.
21. **Clark A. E., Kaleta E. J., Arora A. & Wolk D. M., 2013.** Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26, 547-603.
22. **Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A. & Wolk, D. M. 2013.** Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clinical microbiology reviews*, 26, 547-603.

23. **Cohen N. & Karib H., 2006.** Risque hygiénique lié à la présence des *Escherichia coli* dans les viandes et les produits carnés : Un réel problème de santé publique. *Les Technologies de Laboratoire*, 1, 4-9.
24. **Da cunha M. R. D. S., & Ustulin D. R., 2011.** Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp.
25. **Dallal M. M. S., 2014.** Prevalence of *Salmonella* spp. in packed and unpacked red meat and chicken in south of Tehran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7.
26. **De la loire C. D. P., 2015.** Les toxi-infections alimentaires collectives dans les Pays de la Loire. *Bulletin de veille sanitaire*.
27. **De Noordhout C. M., Devleeschauwer B., Angulo F. J., Verbeke G., Haagsma J., Kirk M., Havelaar A. & Speybroeck N., 2014.** The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 14, 1073-1082.
28. **Delarras, C. 2014.** *Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactéries et de levures-moisissures*, Lavoisier-Tec & Doc.
29. **Dingle T. C. & Butler-Wu S. M., 2013.** MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clinics in laboratory medicine*, 33, 589-609.
30. **Doménech E., Jimenez-Belenguer A., Amoros J. A., Ferrus M. A. & Escriche I., 2015.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food control*, 47, 120-125.
31. **Federighi M., 2005.** *Bactériologie alimentaire : Compendium d'hygiène des aliments*, Economica.
32. **Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M. & Mcsweeney P. L., 2017.** Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. *Fundamentals of Cheese Science*. Springer.
33. **Goh, S. G., Leili, A. H., Kuan, C. H., Loo, Y. Y., Lye, Y. L., San chang, W., ... & Nishibuchi, M. (2014).** Transmission of *Listeria monocytogenes* from raw chicken meat to cooked chicken meat through cutting boards. *Food Control*, 37, 51-55.
34. **González R., Tamagnini L., Olmos P. & De sousa G., 2003.** Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food microbiology*, 20, 601-604.

35. **Gouali M. & Weill F.-X., 2013.** Les *Escherichia coli* entéro hémorragiques : des entérobactéries d'actualité. *La Presse Médicale*, 42, 68-75.
36. **Gravet A. & Gessier M., 2013.** Spectrométrie de masse et microbiologie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28, 297-308.
37. **Grevskott D. H., Svanevik C. S., Wester A. L. & Lunestad B. T., 2016.** The species accuracy of the most probable number (MPN) European Union reference method for enumeration of *Escherichia coli* in marine bivalves. *Journal of microbiological methods*, 131, 73-77.
38. **Guilbot F., Carrabin P., Crociani J. & Dufour C., 2012.** *Salmonella* : Données françaises et européennes sur les produits alimentaires. *Industries Alimentaires et Agricoles*.
39. **Guillet F., Bonnefoy C., Leyral G. & Verne-Bourdais É., 2002.** Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires, Wolters Kluwer France.
40. **Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Gallay, A., Bouvet, P., Gomez, M. and Vaillant, V. (2002).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France, en 1999 et 2000. *Bull. Epidémiol. Hebdo*. 23: 105-109.
41. **Hage E., Mpamugo O., Ohai C., Sapkota S., Swift C., Wooldridge D. & Amar C., 2014.** Identification of six *Listeria* species by real-time PCR assay. *Letters in applied microbiology*, 58, 535-540.
42. **Hamiroune M., Saidani K., Naceur R., Belarbi H. S., Foughalia A. & Berber A., 2017.** Microbiological quality of Merguez in some retailing meat shops in the region of MSila (Algeria). *African Journal of Microbiology Research*, 11, 211-217.
43. **Hance P., Teyssou R., Nicand E. & Buisson Y., 1998.** Sources alimentaires des diarrhées bactériennes. *Toxi-infections alimentaires collectives. Médecine thérapeutique/Pédiatrie*, 1, 25-30.
44. **Hennekinne J. & Le loir Y., 2014.** *Staphylococcus*: Detection by Cultural and Modern Techniques. *Academic Press-Elsevier*.
45. **Hennekinne J.-A., DE Buyser M.-L. & Dragacci S., 2012.** *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS microbiology reviews*, 36, 815-836.

46. **Hernandez-Milian A. & Payeras-Cifre A., 2014.** What is new in listeriosis? Bio Med research international, 2014.
47. **Ilboudo A., Savadogo A., Barro N., Ouedraogo M. & Traore A., 2009.** Qualité hygiénique de la viande tilisée en restauration collective dans trois restaurants universitaires de Ouagadougou (Burkina Faso). Cahiers d'études et de recherché francophone/Santé, 19, 195-199.
48. **ISO 16649, 2001.** Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. International Organization for Standardization.
49. **ISO 6579, 2002.** Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization.
50. **ISO 6888, 2004.** Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). International Organization for Standardization.
51. **ISO 11290, 1996.** Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. International Organization for Standardization.
52. **ISO 7218, 2007.** Microbiology of food and animal feeding stuffs: general requirements and guidance for microbiological examinations. International Organization for Standardization.
53. **Jadhav S., Seviour D., Bhave M. & Palombo E. A., 2014.** Detection of *Listeria monocytogenes* from selective enrichment broth using MALDI-TOF Mass Spectrometry. Journal of proteomics, 97, 100-106.1
54. **Jiang X., Yu T., Wu N., Meng H. & Shi L., 2014.** Detection of qnr, aac (6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* isolated from cooked meat products in Henan, China. International journal of food microbiology, 187, 22-25.
55. **JOA, Journal Officiel Algérien, 1998.** Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998 modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

56. **Karas M., Bachmann D. & Hillenkamp F., 1985.** Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical chemistry*, 57, 2935-2939.
57. **Korsak N., Clinquart A. & Daube G., 2004.** *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. *Ann. Méd. Vét.*, 148, 174-193.
58. **Law J. W.-F., Ab mutalib N.-S., Chan K.-G. & Lee L.-H., 2014.** Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in microbiology*, 5.
59. **Le Hello S., 2014.** *Salmonella* : une bactérie multi-résistante aux antibiotiques dans nos assiettes. *Journal des Anti-infectieux*, 16, 192-198.
60. **Le Minor L. & Véron M., 1990.** Bactériologie médicale, Flammarion médecine-sciences.
61. **Lee N., Kwon K. Y., OH S. K., Chang H.-J., Chun H. S. & Choi S.-W., 2014.** A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* O157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food. *Food borne pathogens and disease*, 11, 574-580.
62. **Leyral G. & Vierling E., 2007.** Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires, Wolters Kluwer France.
63. **Liu H., Lu L., Pan Y., Sun X., Hwang C.-A., Zhao Y. & Wu V. C., 2015.** Rapid detection and differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species in deli meats by a new multiplex PCR method. *Food Control*, 52, 78-84.
64. **Malvy D., Djossou F. & Bras L., 2003.** Infections et toxi-infections d'origine alimentaire et hydrique : orientation diagnostique et conduite à tenir. *EMC Pathologie professionnelle et de l'environnement*, 276-284.
65. **Malvy D., Djossou F. & Le bras M., 1998.** Les toxi-infections alimentaires collectives. Aspects cliniques et épidémiologiques. I. Description. (Première partie). *Cahiers de nutrition et de diététique*, 33, 194-200.

66. **MSPRH, Ministère de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière, 2015.** Rapport de situation épidémiologique évolution des indicateurs période 2000-2015.
67. **Müller A., Stephan R. & Nüesch-inderbilen M., 2016.** Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, 541, 667-672.
68. **Multon J., Linden G., Bourgeois C. & Leveau J., 1991.** Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires.
69. **Ojima-Kato, T., Yamamoto, N., Takahashi, H. & Tamura, H. 2016.** Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) can precisely discriminate the lineages of *Listeria monocytogenes* and species of *Listeria*. *PloS one*, 11, e0159730.
70. **O.M.S., 2002.** La stratégie mondiale de l'OMS pour la salubrité des aliments : une alimentation à moindre risque pour une meilleure santé.
71. **O.M.S., 2015.** Maladies d'origine alimentaire : près d'un tiers des décès surviennent chez les enfants de moins de 5 ans
72. **Patel R., 2015.** MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical chemistry*, 61, 100-111.
73. **Pavlovic M., Huber I., Konrad R. & Busch U., 2013.** Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *The open microbiology journal*, 7, 135.
74. **Pusztahelyi T., Szabó J., Dombrádi Z., Kovács S. & Pócsi I., 2016.** Foodborne *Listeria monocytogenes*: a real challenge in quality control. *Scientifica*, 2016.
75. **Reissbrodt, R. 2004.** New chromogenic plating media for detection and enumeration of pathogenic *Listeria* spp.—an overview. *International journal of food microbiology*, 95, 1-9.
76. **Richard N., 2016.** Manuel de microbiologie appliquée à l'usage des techniciens de l'agroalimentaire et des laboratoires, Lexitis Editions.
77. **Salifou C., Boko K., Aounou G., Tougan P., Kassa S., Houaga I., Farougou S., Mensah G., Clinquart A. & Youssao A., 2013.** Diversité de la microflore initiale de

la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 7, 1351-1369.

78. **Setiani, B., Elegado, F., Perez, M., Mabesa, R., Dizon, E. & Sevilla, C. 2015.** API *Listeria* Rapid kit for Confirmatory Fenotypic Conventional Biochemical Test of the Prevalence *Listeria monocytogenes* in selected meat and meat products. *Procedia Food Science*, 3, 445-452.
79. **Shakerian A., Rahimi E. & Emad P., 2016.** Vegetables and Restaurant Salads as a Reservoir for Shiga Toxigenic *Escherichia coli*: Distribution of Virulence Factors, O-Serogroups, and Antibiotic Resistance Properties. *Journal of food protection*, 79, 1154-1160.
80. **Srey S., Jahid I. K. & Ha S. D., 2013.** Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food control*, 31, 572-585.
81. **Suarez S., Nassif X. & Ferroni A., 2015.** Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathologie Biologie*, 63, 43-52.
82. **Tanaka K., 2003.** The origin of macromolecule ionization by laser irradiation (Nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 42, 3860-3870.
83. **Tanaka K., Waki H., Ido Y., Akita S., Yoshida Y., Yoshida T. & Matsuo T., 1988.** Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2, 151-153.
84. **Todd E. & Notermans S., 2011.** Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484-1490.
85. **Tourdjman M., Laurent É. & Leclercq A., 2014.** Listériose humaine : une zoonose d'origine alimentaire. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014, 37-44.
86. **Van Oye E., 2013.** The world problem of salmonellosis, Springer Science & Business Media.
87. **Verhaegen B., De reu K., Heyndrickx M. & De zutter L., 2015.** Comparison of six chromogenic agar media for the isolation of a broad variety of non-O157 shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serogroups. *International journal of environmental research and public health*, 12, 6965-6978.

88. **Yehia H. M., Ibraheim S. M. & Hassanein W. A., 2016.** Prevalence of *Listeria* species in some foods and their rapid identification. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 1047-1052.
89. **Yves L. L. & Michel G., 2009.** *Staphylococcus aureus*, Lavoisier
90. **Zhu, W., Sieradzki, K., Albrecht, V., Mcallister, S., Lin, W., Stuchlik, O., ... & Rasheed, J. K. (2015).** Evaluation of the Biotyper MALDI-TOF MS system for identification of *Staphylococcus* species. *Journal of microbiological methods*, 117, 14-17.

Annexes

Annexe I : La nature des plats cuisinés et date de prélèvement.

| Nombre d'échantillons | La date de prélèvement | Code | Nature des plats cuisinés | Source |
|-----------------------|------------------------|-------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | 20/02/2017 | Pc 29 | Salade variée | Cantine |
| 2 | 20/02/2017 | Pc 30 | Soupe de poisson | Restaurant |
| 3 | 20/02/2017 | Pc 31 | Hamburger | Restaurant |
| 4 | 20/02/2017 | Pc 32 | Haricot | Restaurant |
| 5 | 21/02/2017 | Pc 33 | Viande hachée | Cantine |
| 6 | 21/02/2017 | Pc 34 | Salade variée | Restaurant |
| 7 | 21/02/2017 | Pc 35 | Sauce aux petit pois | Restaurant |
| 8 | 21/02/2017 | Pc 36 | Les lentilles | Restaurant |
| 9 | 21/02/2017 | Pc 37 | Chorba | Restaurant |
| 10 | 21/02/2017 | Pc 38 | Couscous avec viande | Restaurant |
| 11 | 21/02/2017 | Pc 39 | Sauce à base de légumes et viande | Restaurant |
| 12 | 21/02/2017 | Pc 40 | Sandwich poulet mariné | Restaurant |
| 13 | 22/02/2017 | Pc 41 | Les abats | Restaurant |
| 14 | 23/02/2017 | Pc 42 | Chorba | Restaurant |
| 15 | 23/02/2017 | Pc 43 | Haricots | Restaurant |
| 16 | 23/02/2017 | Pc 44 | Les abats | Restaurant |
| 17 | 28/02/2017 | Pc 55 | Haricots | Cantine |
| 18 | 28/02/2017 | Pc 56 | poisson | Cantine |
| 19 | 28/02/2017 | Pc 57 | Salade variée | Cantine |
| 20 | 28/02/2017 | Pc 58 | Pizza végétarienne | Restaurant |
| 21 | 28/02/2017 | Pc 59 | Spaghetti | Cantine |
| 22 | 28/02/2017 | Pc 60 | Salade variée | Cantine |
| 23 | 28/02/2017 | Pc 63 | Sandwich merguez | Restaurant |
| 24 | 28/02/2017 | Pc 64 | Sandwich karantika | Restaurant |
| 25 | 07/03/2017 | Pc 73 | Pizza | Restaurant |
| 26 | 07/03/2017 | Pc74 | Salade variée | Cantine |
| 27 | 07/03/2017 | Pc 75 | Fritte omelette | Cantine |
| 28 | 07/03/2017 | Pc 76 | Viande hachée | Restaurant |
| 29 | 07/03/2017 | Pc77 | Viande hachée | Cantine |
| 30 | 07/03/2017 | Pc 78 | Salade variée | Cantine |
| 31 | 07/03/2017 | Pc 79 | Salade variée | Cantine |
| 32 | 08/03/2017 | Pc84 | Purée | Restaurant |
| 33 | 08/03/2017 | Pc85 | Viande hachée | Restaurant |
| 34 | 08/03/2017 | Pc 86 | Salade variée | Restaurant |
| 35 | 08/03/2017 | Pc87 | Ragot | Restaurant |
| 36 | 08/03/2017 | Pc88 | Viande hachée | Cantine |
| 37 | 08/03/2017 | Pc89 | Salade variée | Cantine |
| 38 | 09/03/2017 | Pc90 | Riz avec viande hachée | Cantine |
| 39 | 09/03/2017 | Pc91 | Salade variée | Cantine |
| 40 | 09/03/2017 | Pc 92 | Les lentilles | Cantine |
| 41 | 09/03/2017 | Pc 93 | Salade variée | Cantine |
| 42 | 09/03/2017 | Pc 94 | Riz avec poulet rôtie | Restaurant |
| 43 | 14/03/2017 | Pc114 | Salade variée | Cantine |
| 44 | 14/03/2017 | Pc115 | Spaghetti | Cantine |
| 45 | 22/03/2017 | Pc147 | petits pois à la viande rouge | Cantine Entreprise |
| 46 | 22/03/2017 | Pc148 | Purée et poulet | Cantine Entreprise |
| 47 | 22/03/2017 | Pc149 | Ordoeuvre | Cantine Entreprise |
| 48 | 22/03/2017 | Pc151 | Crudité variée | Cantine Entreprise |
| 49 | 22/03/2017 | Pc152 | Poulet rôtie et purée | Cantine Entreprise |
| 50 | 22/03/2017 | Pc154 | Macédoine de légume | Cantine Entreprise |
| 51 | 22/03/2017 | Pc155 | Tadjine de petit pois | Restaurant |

Annexe II : Appareillages.



Bec Bunsen



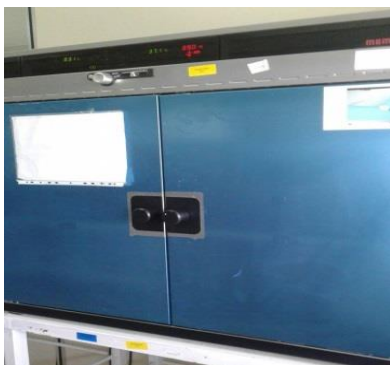
Balance



Stomacher



Hotte à flux laminaire



Etuve à 30 °C ,37°C



Bain marie



Agitateur



Microscope optique



MALDI-TOF-MS de type microflex LT

Annexe III : Composition des milieux de culture et réactifs.

Bouillon Fraser

| | |
|--|----------|
| Peptone de viande | 5.0 g/L |
| Tryptone..... | 5.0 g/L |
| Extrait de viande..... | 5.0 g/L |
| Extrait de levure..... | 5.0 g/L |
| Chlorure de sodium..... | 20.0g/L |
| Hydrogène phosphate disodique dihydraté..... | 12.0g/L |
| Di-hydrogène phosphate de potassium..... | 1.35 g/L |
| Esculine..... | 1.0 g/L |
| Chlorure de lithium..... | 3.0 g/L |
| Sel de sodium d'acide nalixidique..... | 0.02g/L |

pH: 7,2 ± 0,2

Chromogenic *Listeria* Agar (OCLA-ISO)

| | |
|---|--------|
| Enzymatic digest of animal tissues | 18g/L |
| Enzymatic digest of casein | 6g/L |
| Yest extract | 10g/L |
| Sodium pyruvate | 2g/L |
| Glucose..... | 2g/L |
| Magnesium glycerophosphate | 1.0g/L |
| Magnesium sulphate (anhydrous) | 0.5g/L |
| Sodium chloride | 5g/L |
| Lithium chloride | 10g/L |
| Di-sodium hydrogen phosphate (anhydrous)..... | 2.5g/L |

X-glucoside mix0.05g/L
Agar.....12g/L

pH: 7,2 ± 0,2

Gélose au sang

Peptone de viande.....15g
Digestat de foie 23 g
Extrait de levure.....5g
Chlorure de sodium.....5g
Agar-agar..... 9 g à 18 g
Eau..... 1 000ml

pH : 7,4 ± 0,2

Bouillon Tryptone Sel Eau

Peptone de caséine.....10g/L
Chlorure de sodium.....5g/L

pH : 7,5 ± 0,2

Milieu Baird Parker

Digestat pancréatique de caséine..... 10,0 g
Extrait de levure..... 1,0 g
Extrait de viande..... 5,0 g
Pyruvate de sodium..... 10,0 g
L-Glycine..... 12,0 g
Chlorure de lithium.....5,0 g
Agar-agar..... 12 g à 22 g
Eau..... 1 000ml

pH : 7,2 ± 0,2

Milieu Chapman

| | |
|---------------------------------|--------|
| Peptone | 10,0g |
| Extrait de viande de bœuf | 1,0 g |
| Chlorure de sodium | 75,0 g |
| Mannitol | 10,0g |
| Rouge de phénol | 0,025g |
| Agar..... | 15,0 g |
| Eau | 1000mL |

pH = 7,4

Milieu Tryptone-Bile X glucuronide (TBX)

| | |
|--|------------|
| Digestat enzymatique de caséine..... | 20,0 g |
| Sels biliaires No3..... | 1,5 g |
| Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronique(BCIG)..... | 144μmol |
| Sulfoxyde de diméthyle (DMSO) | 3 ml |
| Agar..... | 9 g à 18 g |
| Eau..... | 1 000 ml |

pH : 7,2 ±0,2

E. coli Coliforms Chromogenic Medium

| | |
|------------------------------|--------|
| Peptone bactériologique..... | 3g/L |
| Chlorure de sodium..... | 5 g/L |
| Tampon phosphate..... | 4.9g/L |
| Piryuvate sodique..... | 1 g/L |
| Tryptophane..... | 1g/L |

| | |
|-----------------------------|---------|
| Sorbitol..... | 1 g/L |
| Mélange Chromogénique | 0.36g/L |
| Tergitol-7..... | 0.1 g/L |
| Agar..... | 10g/L |

pH : 6.8 ±0,2

Bouillon Eau Peptonée Tamponnée(EPT)

| | |
|--|----------|
| Digestat enzymatique de caséine..... | 10,0 g |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| Disodium hydrogénophosphate dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O)..... | 9,0 g |
| Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)..... | 1,5 g |
| Eau..... | 1 000 ml |

pH 7, 0 ± 0,2

Bouillon au sélénite acide de sodium et cystéine (SFB S/C)

| | |
|--------------------------|----------|
| Tryptone..... | 5g/L |
| Lactose..... | 4g/L |
| Phosphate disodique..... | 10g/L |
| Sodium sélénite..... | 4g/L |
| L-Cystine..... | 0,010g/L |

pH 7,0 ± 0,2

Gélose Hektoen

| | |
|-------------------------------------|--------|
| Peptone pepsique de viande..... | 12,0 g |
| Extrait autolytique de levure | 3,0 g |
| Lactose..... | 12,0 g |
| Saccharose | 12,0 g |

| | |
|-----------------------------------|--------|
| Salicine..... | 2,0 g |
| Sels biliaires | 9,0 g |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| Thiosulfate de sodium | 5,0 g |
| Citrate ferrique ammoniacal | 1,5 g |
| Bleu de bromothymol | 65 mg |
| Fuchsine acide | 40 mg |
| Agar..... | 13,5 g |

pH : 7,6 ± 0,2

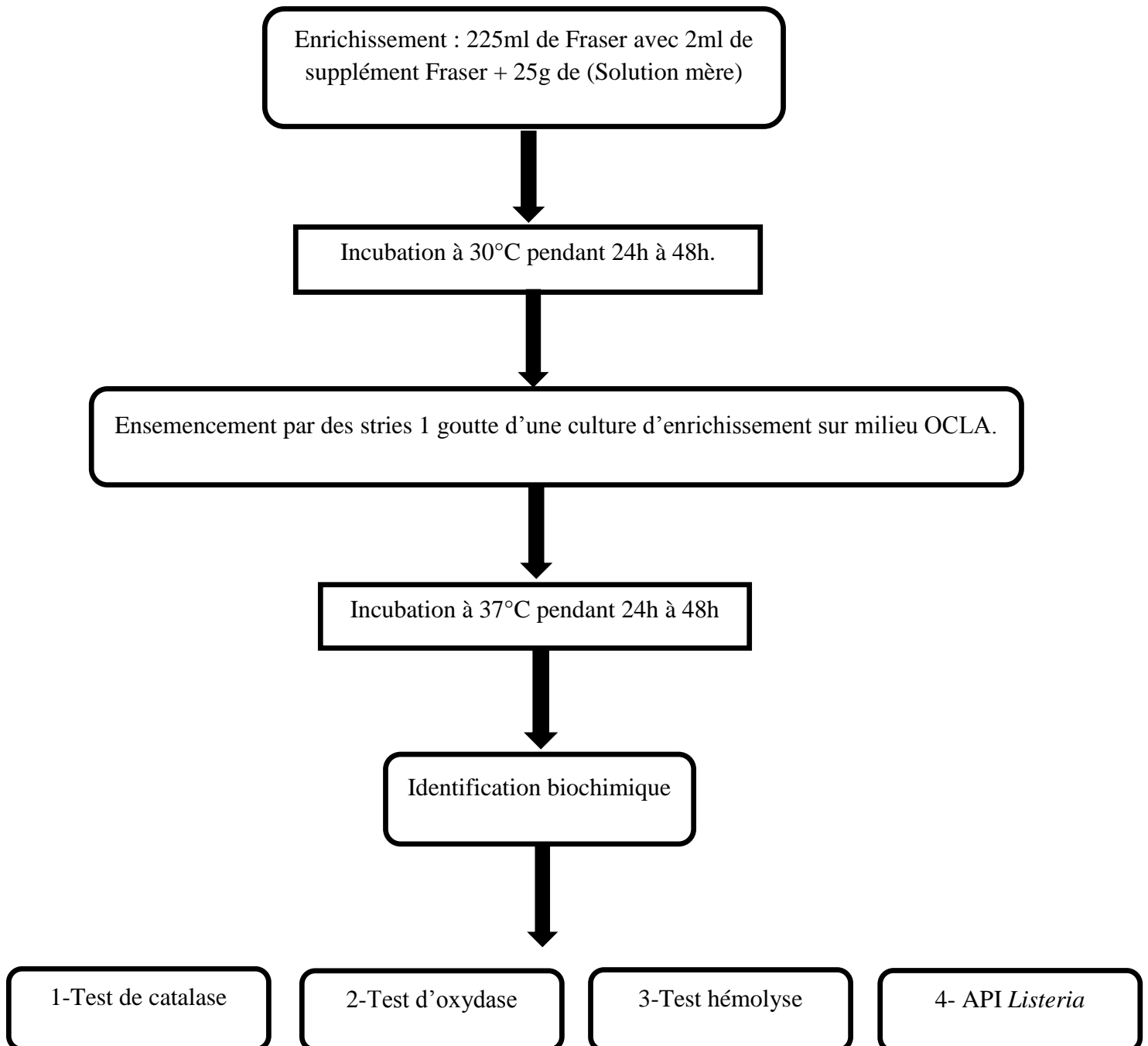
Gélose Triple Sugar Iron (TSI)

| | |
|--------------------------------|------------|
| Extrait de viande..... | 3,0 g |
| Extrait de levure..... | 3,0 g |
| Peptone..... | 20,0 g |
| Chlorure de sodium (NaCl)..... | 5,0 g |
| Lactose..... | 10,0 g |
| Saccharose..... | 10,0 g |
| Glucose..... | 1,0 g |
| Citrate de fer(III)..... | 0,3 g |
| Thiosulfate de sodium..... | 0,3 g |
| Rouge de phénol..... | 0,024 g |
| Gélose..... | 9 g à 18 g |
| Eau..... | 1 000 ml |

pH : 7,4 ± 0,2

Les réactifs :

Péroxyde d'hydrogène H₂O₂, Kovacs, ZYM B, Voges-Proskauer et Tryptophane désaminase (TDA).



Annexe IV : Représentation schématique de mode opératoire de la recherche de *L. monocytogenes*.

Annexe V : Lecture et interprétation des caractères portés sur la galerie API listéria.

| Tests | Composants actifs | QTE (mg /cup) | Réactions | Résultats | |
|---------------|---|------------------|---|--|---------------------------|
| | | | | - | + |
| DIM | Substrat enzymatique | 0.106 | Différenciation <i>L. innocua</i> / <i>L.monocytogenes</i> | <u>ZYMB /<3min</u> Orange pale Rose beige Gris beige | Orange |
| ESC | Esculine citrate de fer | 0.16 0.024 | Hydrolyse (esculine) | Jaune pale | Noir |
| α -MAN | 4-nitrophényl- α D-mannopyranoside | 0.045 | α -MANnosidase | Incolore | Jaune |
| DARL | D-Arabitol | 0.4 | Acidification (D-ARabitol) | Rouge/rouge Orangé | Jaune /Jaune orangé |
| XYL | D-xylose | 0.4 | Acidification (XYLose) | | |
| RHA | L-Rhamanose | 0.4 | Acidification (RHAmnose) | | |
| MDG | Méthyl- α D-glucopyranoside | 0.4 | Acidification (Méthyl- α D-glucopyranoside) | | |
| RIB | D-Ribose | 0.4 | Acidification (RIBose) | | |
| G1P | Glucose-1-Phosphate | 0.4 | Acidification (Glucose-1-Phosphate) | | |
| TAG | D-Tagatose | 0.4 | Acidification(TAGtose) | | |

(-) : Négatif

(+) : Positif

Enrichissement : 225ml de TSE +25g
d'échantillon (Solution mère)

Ensemencement sur gélose Baird Parker : 0.2ml de la suspension mère est étalé
soigneusement sur toute la surface de la boîte.

Incubation à 37°C pendant 24h

Identification biochimique

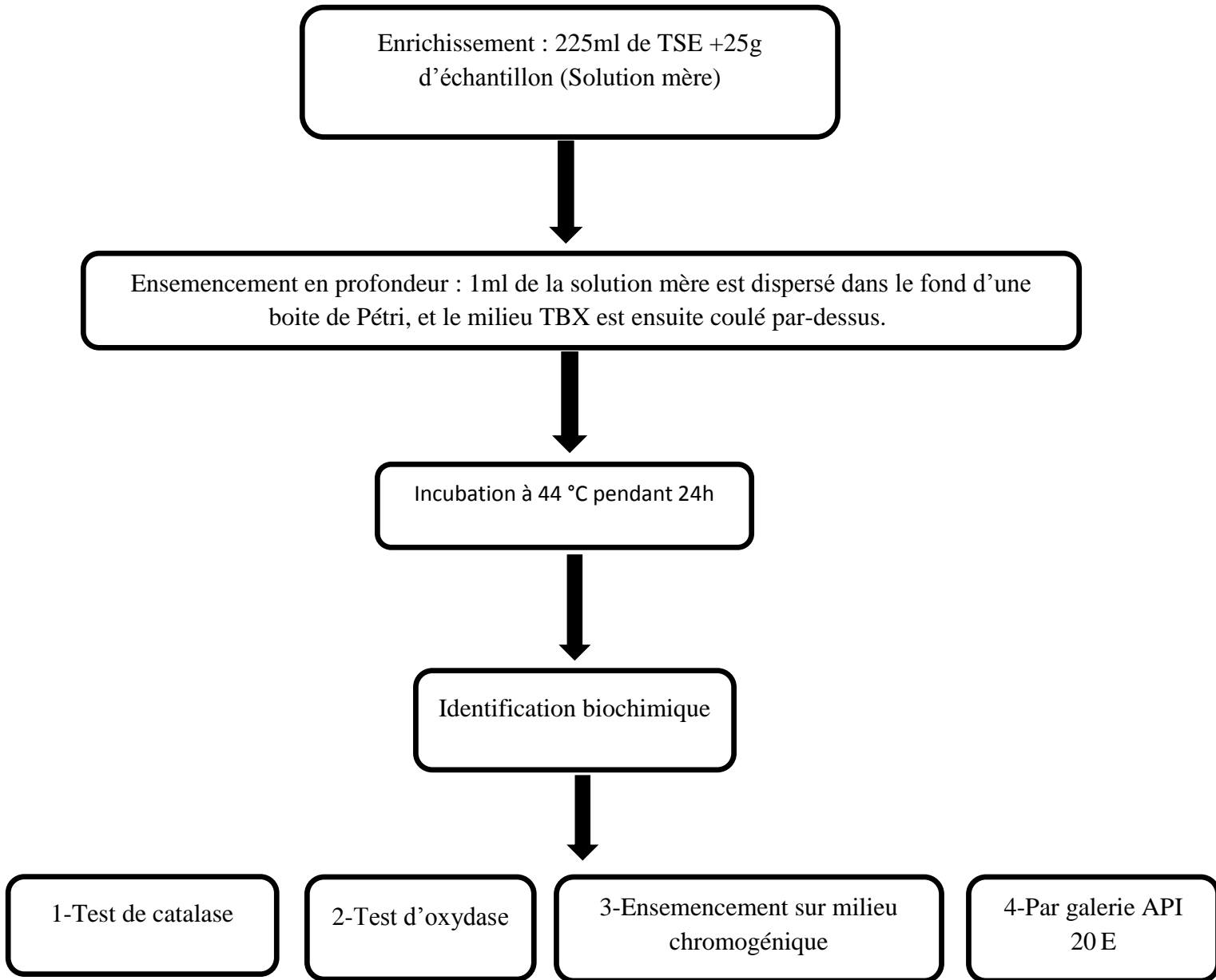
1-Recherche de mannitol

2-Test de catalase

3-Test d'oxydase

4-Test de coagulase

Annexe VI : Représentation schématique de mode opératoire de la recherche de *S. aureus*.



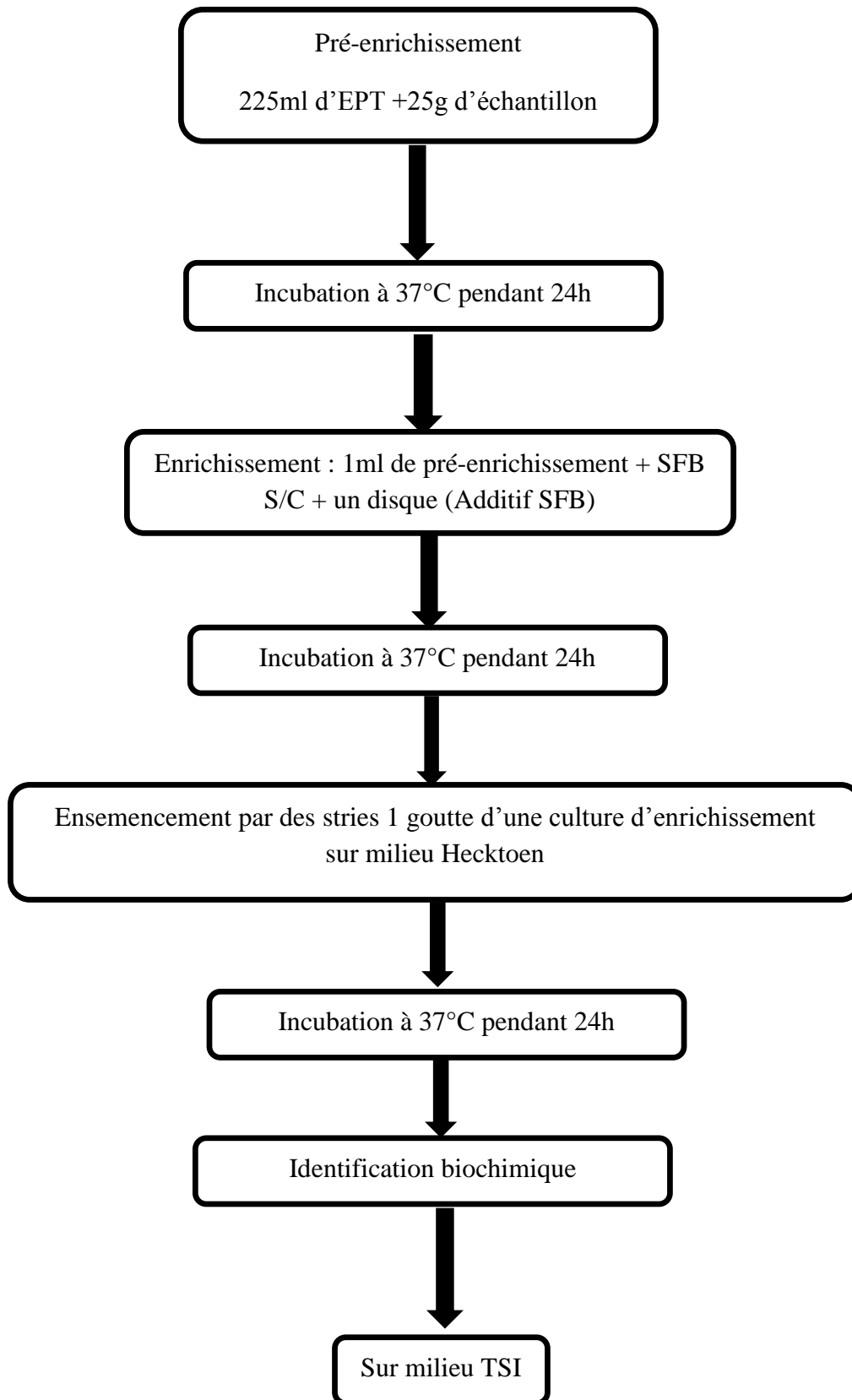
Annexe VII : Représentation schématique de mode opératoire de la recherche de *E coli*.

Annexe VIII : Lecture et interprétation des caractères portés sur la galerie API 20E.

| TEST S | COMPOSANTS ACTIFS | QTE (mg/cup) | REACTIONS/ENZYMATIQUES | RESULTATS | |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------|--|-----------------------------|---|
| | | | | NEGATIF | POSITIF |
| ONPG | 2-nitrophényl- βD-galactopyranoside | 0.223 | β-galactosidase (Ortho Nitro Phenyl- βD-Galactopyranosidase) | incolore | Jaune (1) |
| <u>ADH</u> | L-arginine | 1.9 | Arginine Di Hydrolase | Jaune | Rouge/orangé (2) |
| <u>LDC</u> | L-lysine | 1.9 | Lysine Décarboxylase | Jaune | Rouge/orangé (2) |
| <u>ODC</u> | L-ornithine | 1.9 | Orniithine Décarboxylase | Jaune | Rouge/orangé (2) |
| <u>[CIT]</u> | Trisodium citrate | 0.756 | Utilisation de Citrate | Vert pale/ jaune | Bleu vert/bleu (3) |
| <u>H₂S</u> | Sodium thiosulfate | 0.075 | Production d'H ₂ S | Incolore/grisâtre | Dépôt noir/fin liseré |
| <u>URE</u> | urée | 0.76 | Urease | Jaune | Rouge/orangé (2) |
| TDA | L-tryptophane | 0.38 | Tryptophane Désaminase | Jaune | <u>TDA / immédiat</u> marron-rougeâtre |
| IND | L-tryptophane | 0.19 | Production d'Indole | Incolore Vert pâle/Jaune | <u>JAMES / immédiat</u> Rose |
| <u>[VP]</u> | Sodium pyruvate | 1.9 | Production d'acétine (voges Proskauer) | Incolore/ rose pâle | <u>VP 1+ VP 2 / 10 min</u> rose/ rouge (5) |
| <u>[GEL]</u> | Gélatine (origine bovine) | 0.6 | Gélatinase (Gélatine) | Non diffusion | Diffusion du pigment noir |
| GLU | D-glucose | 1.9 | Fermentation/oxydation (Glucose) (4) | Bleu/bleu-vert | Jaune/jaune gris |
| MAN | D-mannitol | 1.9 | Fermentation/oxydation (Mannitol) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| INO | inositol | 1.9 | Fermentation/oxydation (Inositol) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |

| | | | | | |
|-----|-----------------------------|------|---|-------------------------------|-------|
| SOR | D-sorbitol | 1.9 | Fermentation/oxydation (sorbitol) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| RHA | L-rhamnose | 1.9 | Fermentation/oxydation (rhamnose) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| SAC | D-saccharose | 1.9 | Fermentation/oxydation (saccharose) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| MEL | D-melibiose | 1.9 | Fermentation/oxydation (Melibiose)(4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| AMY | Amygdaline | 0.57 | Fermentation/oxydation (Amygdaline) (4) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| ARA | L-arabinose | 1.9 | Fermentation/oxydation (Arabinose) | Bleu/bleu vert | Jaune |
| OX | Voir notice de test Oxydase | | Cytochrome-oxydase | (voir notice du test oxydase) | |

- (1) Une très légère couleur jaune est également positive.
- (2) Une couleur orange apparaissant après 38-48h d'incubation doit être considérée négative.
- (3) Lecture dans la cupule (zone aérobie).



Annexe IX : Représentation schématique de mode opératoire pour la recherche de *Salmonella* spp.