



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*En vue de l'obtention du diplôme de master en
Sciences de la Nature et de la Vie
Filière Sciences Biologiques
Option : Génétique et physiologie*

Thème :

Identification des bactéries pathogènes par PCR en temp réel

Présenté par :

TLEMÇAN Hayette

BARKAT Hayet

Devant le jury :

Mr. Oussaadou L. MAA U. Blida1 President

Mr. Guetarni Dj. Prof. U. Blida1 Examineur

Mr. Mohamed said R. MCB U. Blida1 Promoteur

Mr. Benayad T. MA IPS Co-promoteur

Remerciements

Nous tenant à remercier dieu-pour avoir accordé santé et Courage jusqu'à l'aboutissement de nos études et l'accomplissement de ce travail.

Nous tenant a remercier :

Notre promoteur Mr Mohamed Said qui nous a encadré avec toute son attention et sa patience,et de nous avoir dirigé et aider afin de mener a bien cette étude.

Notre encadreur Mr BENAYAD Taher responsable du laboratoire centrale de la police scientifique qui nous a mis tous les moyen a notre disposition et nous a guidé tout au long de ce travail..

Nos remerciements à Mr Oussadou et Professeur Guetarni en leur qualité de membre du jury qui ont accepté d'examiner notre travail

Aussi sans exception nos remerciements à tout le personnel du laboratoire pour leur suivi tout au long de ce stage .

Nous avons l'honneur d'exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements a tous ceux et celles qui nous ont soutenus de près ou de loin lors de la réalisation de ce modeste travail .

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

a mon père

En reconnaissance des sacrifices que tu n'aurais cessé de déployer pour
l'éducation de tes enfants ; ce mémoire est ta toi

a ma chère mère

En reconnaissance des sacrifices que tu as consentis pour l'éducation de tes
enfants ; puisse dieu le tout puissant te prêter longue vie

à ma sœur Nawel et mes frères Juffik et Fayaçl

à mon amie intime Habiba

à mon binôme Hayet

à tous mes ami(e)s

À tous ceux que j'aime et ceux qui m'aiment

Hayet . B

Dédicace

Je dédie ce modeste travail :

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études. Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon père

Merci pour tout le bien que tu as fait pour moi que dieu te garde .

A mon très cher frère Chouaibet à ma très chère soeur Fellaet son mari Karim et son bébé.

Je saisis cette occasion pour exprimer mes remerciements à madame Boukhari Nadia et madame Behloule Djamilia. Sans vos aide, vos conseils et vos encouragements ce travail n'aurait vu le jour. Veuillez trouver dans ce modeste travail ma reconnaissance pour tous vos efforts.

A tous mes chères amies et collèguesa mon binome Hayet et tous les étudiants de la promotion 2016/2017

Hayet .T

Liste des abréviations

μ : Micro

μl : Microlitre

μm :micromètre

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

Ct : cycle threshold

dNTP :desoxynucléotide triphosphate

E.coli : Escherichia coli

FRET : fluorescence resonance energy transfer

MIA : maladies infection alimentaires.

ml :mililitre

Mm :milimètre

Min :minute

N° : Numéro

Nm :Nanomètre

OMS : Organisation mondiale de la Santé

PCR: « *Polymerase by Chain Reaction* »

pH :potentielhydrogène

RT-PCR : real time -*Polymerase by Chain Reaction*

S. aureus : Staphylococcus aureus

Taq : Thermusaquaticus

TIA : Toxi infection alimentaires ou « intoxication »

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

Tm : Temperaturemelting

TSE :Tryptone Sel Eau

UFC :Unité Faisant Colonie

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

SOMMAIRE

Remerciements

Dédicaces

Résumé

Liste d'abréviation

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction..... 1

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|--|----|
| Chapitre I : les bactéries pathogènes | 4 |
| I-A- la Salmonella: Agent pathogène dans les aliments | 7 |
| I-B-1: staphylococcus aureus : agent pathogène dans les aliments | 11 |
| I-C-1 : Escherichia coli : agent pathogène dans les aliments..... | 15 |
| Chapitre II : la PCR en temps réel | 19 |

PARTIE PRATIQUE

| | |
|--|----|
| Chapiter I : Matériel et méthodes | 31 |
| II-1 : Matériels..... | 31 |
| II-1-1 : Matériel biologique | 31 |
| II-1-2 : listes des kits PCR | 31 |
| II-2 : Méthodes | 32 |
| II-2-1 : analyses microbiologiques | 32 |
| II.2.1.1.Analyse microbiologique de viande..... | 32 |
| II.2.1.1.a. préparation de la solution mère et des dilutions | 32 |
| II.2.1.1.b. Recherche de salmonella..... | 33 |
| II-2-1-1-b.1 : pré enrichissement et enrichissement d'échantillon..... | 33 |
| II-2-1-1-b-2 :isolement de bactérie salmonella | 33 |
| II-2-1-1-b-3.: Identification de salmonella | 35 |
| II.2.1.2 :Analyse microbiologique des abats de poulet crus | 35 |

| | |
|---|----|
| II.2.1.2.a. Préparation de la solution mère et des dilutions | 35 |
| II.2.1.2.b/- Recherche de Staphylococcus aureus | 35 |
| II-2-1-2.b.1 : l'enrichissement d'échantillon..... | 35 |
| II-2-1-2.b.2 : techniques d'isolement des bactéries pathogènes (Staphylococcus aureus)..... | 35 |
| II.2.1.2.b.3 : Identification des espèces du genre Staphylococcus aureus | 37 |
| II.2.1.2.c. Recherche de salmonella | 39 |
| II.2.1.3- Analyse microbiologique de camembert | 39 |
| II.2.1.3.a. Préparation de la solution mère et des dilutions | 39 |
| II.2.1.3.b/ :Recherche de Escherichia coli | 39 |
| II-2-1-3.b.1 : techniques d'isolement des bactéries pathogènes (Escherichia coli)..... | 39 |
| II.2.1.3.c.Recherche de Staphylococcus aureus | 41 |
| II.2.1.4.Analyse microbiologique du lait cru | 41 |
| II.2.1.4.a- préparation de la solution mère et des dilutions | 41 |
| II.2.1.4.b.Recherche de Staphylococcus aureus : | 41 |
| II.2.1.4.c.Recherche de Staphylococcus aureus : | 41 |
| II-2-2 : analyse génétique | 42 |
| II-2-2-1 : L'extraction de l'ADN | 42 |
| II.2.2-2 : L'amplification et l'identification des bacteries : | 44 |
| II.2.2-2 .a: L'amplification et l'identification des staphylococcus aureus par PCR en temp réel | 44 |
| II.2.2-2 a.Manuel mericon PCR kit S.Aureus (24)..... | 44 |
| - Introduction | 44 |
| -Principe | 44 |
| -Extraction d'ADN | 45 |
| 1 - Contrôle négatif | 45 |
| 2 - Contrôle positif..... | 45 |
| II.2.2-2 : L'amplification et l'identification de Salmonella spp par PCR en temp réel..... | 46 |
| II.2.2-2 a.Manuel mericon PCR kit Salmonella spp (24))..... | 46 |
| - Introduction | 46 |
| -Principe | 46 |
| -Extraction d'ADN | 47 |

| | |
|--|----|
| 1 - Contrôle négatif | 47 |
| 2 - Contrôle positif..... | 47 |
| II.2.2-3.. Protocole : Préparation manuelle du test | 47 |
| II.2.2-4 : protocole expérimental de l'analyse par Rotor-gène Q series software système..... | 50 |
| Chapiter II : résultats et discussion..... | 52 |
| II.1 : résultats..... | 52 |
| II. 1.A/ résultats d'analyse microbiologique : | 52 |
| II.1. A.1. La viande | 52 |
| II.1.A.1.1. Isolement et identification des espèces salmonella..... | 52 |
| II.1. A.2.Les abats de poulet crus..... | 53 |
| II. 1.A/2/1. Isolement et dénombrement des espèces staphylococcus aureus:..... | 53 |
| II.1.A/2/2.Identification de l'espèce Staphylococcus aureus..... | 53 |
| III.1. A.2.2 .1 Examen macroscopique..... | 53 |
| II.1.A..2.2.2.Examen biochimique :..... | 54 |
| II.1. A.3.Le camembert..... | 54 |
| II.1. A.4.Le lait cru | 55 |
| II.1.B résultats d'analyse génétique :..... | 56 |
| II.1. B.1 - l'interprétation des résultats..... | 56 |
| II.1.B.1.1.Résultats de l'analyse génétique des abats de poulet crus | 57 |
| II.1.B.1.2.Résultats de l'analyse génétique de viande | 58 |
| II.2 Discussion..... | 59 |
| III-conclusion | 62 |
| Références bibliographiques | |
| Annexe | |

Résumé

Les différents aliments destinés à l'homme peuvent être contaminés à plusieurs stades de leur production et élaboration par des agents pathogènes variés (virus, bactéries, parasites ..etc) ces agents pathogènes connus comme étant causes de maladies et des toxi –infection alimentaires dont les effets peuvent être graves, voire pour certains mortels. Parmi les bactéries pathogènes les plus souvent évoqués sont les Staphylococcus aureus, Escherichia coli, la Salmonelle ..etc. la détection et l'identification de ces bactéries pathogènes d'origine alimentaire nécessite plusieurs méthodes, notre travail discute et confirme, après une explication détaillée sur la PCR en temps réel ; les résultats de la méthode d'analyse microbiologiques conventionnelles étudiée sur un échantillon alimentaire avec les résultats de la méthode d'analyse génétique basée sur l'utilisation de la technologie RT-PCR qui présente un outil de choix qui a permis de simplifier et de quantifier le nombre de molécules ou de copies d'un gène d'intérêt dans un échantillon donné et même réduit considérablement le temps total nécessaire à la détection de différents agents pathogènes d'origine alimentaire

Mots clés : PCR en temps réel, bactéries pathogènes, cycle seuil Ct, identification

Abstract :

Different foods destined for humans can be contaminated at several stages of their production and elaborated by various pathogens (viruses, bacteria, parasites etc.), these pathogens known as causes of diseases and foodborne infections, The effects can be serious, even for some mortals. Among the most frequently mentioned pathogenic bacteria are Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Salmonella, etc.. The detection and identification of these pathogenic bacteria of food origin requires several methods, our work discusses and confirms, after a detailed explanation on the PCR in real time,; The results of the conventional microbiological analysis method studies on a food sample with the results of the method of genetic analysis based on the use of the RT-PCR technology which presents a tool of choice which has simplified and quantified The number of molecules or copies of a gene of interest in a given sample and even considerably reduces the total time required for the detection of various foodborne pathogens

Keywords: real-time PCR, pathogenic bacteria, threshold cycle Ct. Identification

Liste des tableaux

| N° | Titre de tableau | Page |
|-----------|--|-------------|
| 01 | Bactéries pathogènes pour l'homme | 06 |
| 02 | Contenu du kit DNeasy® mericon® Food Handbook | 31 |
| 03 | Contenu du kit Le kit mericon PCR kit S.Aureus (24) | 32 |
| 04 | Contenu du kit Sallmonella spp (24) | 32 |
| 05 | Préparation du mélange réactionnel | 49 |
| 06 | Programme PCR | 50 |
| 07 | Résultats des analyses microbiologique de la viande | 52 |
| 08 | Résultats des analyses microbiologique des abats de poulet crus | 53 |
| 09 | Résultats des analyses microbiologique de camembert | 54 |
| 10 | Résultats des analyses microbiologique des échantillons de lait cru | 55 |
| 11 | Résumé des résultats possibles | 56 |

Liste des figures

| N° | Titre de figure | Page |
|-----------|---|-------------|
| 01 | Coloration de Gram de <i>S. aureus</i> | 12 |
| 02 | Culture de <i>S. aureus</i> sur gélose au sang | 12 |
| 03 | Pathogénie associée aux six classes de <i>E. coli</i> responsables de diarrhées | 16 |
| 04 | Principe de la PCR quantitative en temps réel associée à la chimie TaqMan | 24 |
| 05 | les trois phases de la réaction PCR | 27 |
| 06 | enrichissement et isolement de salmonella | 34 |
| 07 | enrichissement et isolement des staphylocoques pathogènes | 36 |
| 08 | technique de recherche de staphycoagulase | 38 |
| 09 | Préparation des dilutions d'échantillon du camembert et ensemencement | 40 |
| | Observation macroscopique sur milieu Hektoen (absence de salmonelle) | 52 |
| 10 | Observation macroscopique de face de <i>Staphylococcus aureus</i> | 53 |
| 11 | Test de coagulase positif de bactérie <i>Staphylococcus aureus</i> | 54 |
| 12 | Observation macroscopique de face d' <i>Escherichia coli</i> | 55 |
| 13 | Graphique d'amplification de PCR en temps réel | 58 |
| 14 | Graphique d'amplification de PCR en temps réel (Salmonelle). | 59 |

I – Introduction

L'évolution des maladies d'origine alimentaire infectieuse dans le monde et en particulier en Algérie, semble être liée à la présence de microorganismes dans les aliments. Ces maladies constituent pourtant le problème de santé publique le plus répandu dans le monde et génèrent un fardeau social et économique représentant ainsi une source de souffrances humaines.

La gastroentérite à *Escherichia coli* peut être causée par diverses souches d'*Escherichia coli*. Sera abordée ici la gastroentérite à *Escherichia coli* entérohémorragique (ECEH), qui est causée par une souche d'*Escherichia coli* capable de sécréter une toxine pouvant causer un syndrome hémolytique et urémique (SHU) avec atteinte des systèmes sanguin et rénal. Cette bactérie est aussi appelée *Escherichia coli* producteur de vérocytotoxines (VTEC) ou de shigatoxines (STEC).

Ainsi que Le staphylocoque doré (*Staphylococcus aureus*) la souche bactérienne la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine partage avec la bactérie *Escherichia coli* le triste privilège d'être au premier rang des germes responsables d'infections ou bactériémies nosocomiales (infections contractées à l'hôpital), en cas d'intoxication alimentaire, on constate chez le patient des douleurs abdominales, des nausées et vomissements, des crampes d'estomac et de la diarrhée. Dans les cas les plus graves, les bactéries rentrent dans le flux sanguin et y prolifèrent. C'est ce qu'on appelle une septicémie, ou infection du sang. Cela provoque une forte fièvre, des maux de tête, des douleurs musculaires et parfois un choc toxique potentiellement mortel.

La salmonellose est une autre maladie causée par une autre bactérie pathogène bacille à Gram de genre *Salmonella*, naturellement présente dans l'intestin des animaux en particulier chez les volailles et le porc, et chez certains animaux à sang froid. C'est une bactérie qui représente la première cause d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (Colin P. et al, 1992).

Malgré l'augmentation de la prévention contre la transmission de ces maladies par les denrées alimentaires, l'importance de la salubrité des aliments n'est pas appréciée à sa juste valeur en Algérie. Ainsi il est important d'utiliser des moyens sur l'identification de germe *Salmonella*, *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* .etc. , afin de pouvoir les détecter dans les produits alimentaires.

L'amplification des acides nucléiques (PCR) permet le diagnostic rapide des infections causées par des micro-organismes pathogènes pour lesquels la culture est difficile, voire impossible. Ainsi, la PCR a largement amélioré notre capacité à diagnostiquer les infections dues

à des bactéries pathogènes . De plus, la PCR est attractive en raison de sa rapidité, sensibilité et reproductibilité. Cependant, il est utile de connaître les limites des analyses PCR afin d'interpréter correctement les résultats obtenus. L'interprétation est fonction de la fiabilité des tests utilisés, des pathogènes recherchés, du site d'infection, et de la présentation clinique. Il est essentiel que les cliniciens et les microbiologistes partagent leurs expériences, afin que les niveaux analytiques et cliniques d'interprétation puissent être combinés.

L'objectif de ce travail consiste à étudier trois germes pathogènes *eschérichia coli*, *Staphylococcus aureus* et salmonella en tant que contaminants alimentaires, aboutissant chez l'homme à des troubles digestive. Cette étude se base sur la recherche de ces 03 germes dans les aliments sur le territoire Algérien. Après leur isolement sur des milieux sélectifs, ces souches seront par la suite Identifiées sur deux plans : caractérisation biochimique par les tests classiques d'identification et caractérisation moléculaire en utilisant la technique PCR en temp réel.

Partie

Bibliographique

I - Bactérie pathogène :

Une bactérie , un micro-organisme unicellulaire (**procaryote**) de petite taille, de morphologie variable qui présente des caractéristiques propres.

La taille d'une bactérie varie entre 1 à 10 µm. Le poids d'une bactérie est d'environ 10-12 g. Elle contient 70% d'eau. Rapporté au poids sec, une bactérie est constituée de protéines (55%), de lipides (10%), de lipopolysaccharides (3%), de peptidoglycane (3%), de ribosomes (40%), d'ARN (20%) et d'ADN (3%)

(anonyme,2014)

I-1- Définition :

Les bactéries pathogènes sont à l'origine de toxi-infection alimentaire (intoxication) et les maladies infectieuses d'origine alimentaire.

(DROUET,2011/2012)

I-2- Effets des bactéries sur les aliments :

Les bactéries produisent deux types d'effet sur les aliments :

- ✓ **Altération des aliments** : les bacteries dégradent les aliments : ils altèrent le goût, l'odeur, l'aspect, en somme la qualité marchande du produit.
- ✓ **Les maladies alimentaires** : des bacterie dit pathogènes se développent dans les aliments entraînant deux types de maladies alimentaires : les toxi-infection alimentaires ou intoxication et les maladies infections alimentaires.

I-3- Le pouvoir pathogène :

Le pouvoir pathogène (du grec ancien πατος [pathos], « souffrance » et . γένος [genos], « naissance »ou «pathogénicité »

La pathogénicité d'une bactérie mesure sa capacité à provoquer des troubles chez son hôte dont les mécanismes de défense sont normaux . Il varie selon la souche et dépend de son pouvoir invasif (capacité à se répandre dans les tissus et à y établir un ou des foyers infectieux), de son pouvoir toxicogène (capacité à produire des toxines) et de sa capacité à se reproduire.

(PEBRET, 2003)

On distingue trois catégories de bactéries pathogènes :

- les bactéries pathogènes strictes (ou spécifiques), qui provoquent des troubles quel que soit le patient (à l'exception des porteurs sains) ; par exemple : *Salmonella Typhi* et *Vibrio cholerae*
- les bactéries pathogènes opportunistes, qui provoquent des troubles lorsque les défenses immunitaires de l'hôte sont affaiblies ou que la personne est âgée (on parle aussi de sujets immunodéprimés) ; par exemple : *Pseudomonas aeruginosa*.
- les bactéries pathogènes occasionnelles, qui sont le plus souvent inoffensives mais dont certaines souches sont pathogènes. On retrouve dans cette catégorie des bactéries commensales comme *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*.

(Louise et al , 2001)

I-4- Les bactéries pathogènes pour l'homme

Elles sont très nombreuses et de nouveau ici la pathogénicité dépend aussi, parfois, du nombre de bactéries, des conditions d'ingestion, de l'état de santé du patient ...etc.

Certaines cependant sont toujours pathogènes, même à doses très faibles et même chez des gens en bonne santé lors de l'infection. Voici quelques exemples de bactéries pathogènes pour l'homme

(konig, 2007)

| | | | |
|------------------|------------------------------------|-------------------|------|
| Charbon | <i>Bacillus anthracis</i> | Koch | 1876 |
| Blennorragie | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Neisser | 1879 |
| Fièvre typhoïde | <i>Salmonella Typhi</i> | Eberth | 1880 |
| Tuberculose | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | Koch | 1882 |
| Choléra | <i>Vibrio cholerae</i> | Koch | 1883 |
| Diphthérie | <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | Klebs/Loeffler | 1883 |
| Tétanos | <i>Clostridium tetani</i> | Nicolaier | 1885 |
| Diarrhée | <i>Escherichia coli</i> | Eschenich | 1885 |
| Pneumonie | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Fraenkel | 1886 |
| Méningite | <i>Neisseria meningitidis</i> | Weischselbaum | 1887 |
| Fièvre ondulante | <i>Brucella sp.</i> | Bruce | 1887 |
| Gangrène gazeuse | <i>Clostridium perfringens</i> | Welch et Nuttal | 1892 |
| Peste | <i>Yersinia pestis</i> | Yersin/Kitasato | 1894 |
| Botulisme | <i>Clostridium botulinum</i> | Van Ermengem | 1896 |
| Dysenterie | <i>Shigella dysenteriae</i> | Shiga | 1898 |
| Syphilis | <i>Treponema pallidum</i> | Schaudin/Hoffmann | 1905 |
| Coqueluche | <i>Bordetella pertussis</i> | Bordet et Gengou | 1906 |
| Méningite | <i>Rickettsia rickettsii</i> | Ricketts | 1909 |

Tableau 01 : Bactéries pathogènes pour l'homme

(konig, 2007)

I-A- la *Salmonella*: Agent pathogène dans les aliments :

I.A.1. Définition des *Salmonella* :

Les *salmonella* sont des bactéries mésophiles, ayant une température optimale de croissance de 35/37°C, cependant les Salmonelles peuvent se multiplier de 5°C à 45/47°C avec une croissance nettement retardée par les températures inférieures à 10°C.

Elles supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9,0 avec un optimum de 6,5 à 7,5. La persistance des *Salmonella* dans les mayonnaises fortement acides (pH 3, 2) a été signalée. D'autre part, une épidémie de *Salmonella Typhimurium* a fait 504 victimes dans le Sud de l'Australie en mars 1999 ; l'aliment incriminé était un jus d'orange frais industriel

Les Salmonelles résistent parfaitement à la dessiccation et se développent bien dans des valeurs d' A_w de 0,945 à 0,999, elles peuvent trouver dans des produits déshydratés ($A_w = 0,20$). Ces bactéries sont assez sensibles à NaCl, mais néanmoins leur présence a été reconnue dans des saumures à 3,2 %. La concentration maximale tolérée serait de 5,8 %

(Robinson et al; 2000).

I.A.2. Taxonomie

Règne : Procaryotes (ouprocaryotae)

Embranchement (phylum) : Proteobacteria

Classe : Gammaproteobacteria

Famille : Enterobacteriaceae

Genre : salmonella, se subdivise en trois espèces

Espèces : -*Salmonella enterica* : avec 6 sous espèces:

- S/e I ou sous espèce enterica.
- s/e II ou sous espèce salamae.
- s/e IIIa ou sous espèce arizonae.
- S/e IIIb ou sous espèce diarizonae.
- S/e IV ou sous espèce houtenae.
- S/e VI ou sous espèce indica.

-*Salmonella bongori* (symbole V).

-*Salmonella subterranea*

(langridge et al , 2005)

I.A.3. Caractéristiques bactériologiques :

Caractéristique morphologique :

Les *salmonella* ont une paroi épaisse de 8 à 12 nm. En microscopie optique, elles apparaissent comme des bâtonnets à Gram négatif de 0,3 à 1 µm de largeur et longs de 1 à 6 µm. Le constituant le plus essentiel dans une membrane des bactéries à Gram-, est un lipide complexe ; lipopolysaccharide (LPS). Ces lipopolysaccharides sont des complexes macromoléculaires toxiques présents de manière constitutive dans la membrane externe.

Les *salmonella* sont des bactéries mobiles grâce à de fins filaments protéiques capilliformes ; les flagelles. Ils présentent trois parties: (i) un Filament hélicoïdal rigide de 10 µm de longueur. (ii) Le crochet, très court (60 nm). (iii) Le corpuscule basal, il correspond à la zone d'insertion du flagelle dans le corps cellulaire. Cette structure est douée d'un pouvoir pathogène par l'intermédiaire de l'antigène flagellaire H, celui-ci est constitué de sous-unités protéiques : flagellines

(Avril et al., 1992).

. Les caractères phénotypique :

Les *Salmonella* possèdent les caractères généraux de la famille des Enterobacteriaceae et des caractères différentiels intrinsèques :

-les caractères de la famille du genre *Salmonella* :

Huit principaux caractères déterminent la famille d'Enterobacteriaceae : ces sont des bacilles à coloration de Gram négatif. Souvent mobiles grâce à leur ciliature péritriche (rarement immobiles), non sporulés. Ils cultivent sur les milieux ordinaires, ont un caractère aéroanaérobies facultatifs, ils sont capables de fermenter le glucose avec ou sans production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites. Ces germes ne possèdent pas de cytochrome oxydase (Hanes, 2003). Ils possèdent une catalase. Certaines souches n'obéissent pas à tous ces caractères, c'est le cas de : *Erwinia* qui ne réduit pas les nitrates, de *Shigella dysenteriae* sérotype 1 (SD1) qui ne possède pas de catalase, de *Salmonella galinarum* - pullorum qui est immobile. (ICMSF., 1996).

-les caractères différentiels du genre *Salmonella* :

Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification du genre *Salmonella* (Humbert et al, 1998) sont : L'absence d'une uréase active, de tryptophane ou de phénylalanine désaminase. L'absence de production d'indole et d'acétoïne (test de Voges-

Proskauer négatif). La production d'hydrogène sulfureux à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase). La décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine. La pousse fréquente sur le milieu au citrate de Simmons. L'absence de fermentation du lactose, **(Grimont et al, 2000).**

I.A.4. Habitat :

Les salmonelles sont des bactéries du tube digestif des vertébrés. Elles sont essentiellement répandues dans le milieu extérieur à partir des excréta. Lorsque les conditions de milieu sont favorables (température et humidité) les salmonelles peuvent survivre plusieurs mois dans l'environnement

La sous-espèce *enterica* est adaptée aux animaux à sang chaud dont l'homme. Les autres sous-espèces sont quant à elles retrouvées chez des animaux à sang froid comme les reptiles, les batraciens ou les tortues **(Danyluk et al., 2008).**

Dans de nombreux cas, les animaux sont considérés comme des porteurs asymptomatiques. Cependant, dans d'autres cas, certains d'entre eux peuvent présenter des signes cliniques plus ou moins sévères. **(Grimont et al, 2007).**

Les salmonelles sont ubiquitaires, non sporulées, pouvant être isolées de nombreuses niches écologiques et sont capables de résister à plusieurs stress environnementaux. Ce sont des germes mésophiles (température optimale de croissance entre 35°C et 37°C), aéroSynthèse bibliographique anaérobies facultatives avec de faibles exigences culturelles. Elles survivent à des pH variant entre 4,1 et 9 avec un optimum entre 6,5 et 7,5 (Borch et al., 1996). La croissance est possible pour des activités de l'eau (aw) de 0,95. De ce fait, la viande et les produits carnés constituent d'excellents milieux pour la croissance de *Salmonella* spp. Mais cette bactérie reste relativement sensible à la chaleur même si certains stress semblent pouvoir augmenter sa thermo-résistance **(Humphrey et al., 1997).**

I.A.5. Pouvoir pathogène de *Salmonella* :

La salmonellose est une maladie infectieuse causée par un groupe de bactéries appelé *Salmonella*, Les personnes qui consomment des aliments contaminés par la *Salmonella* sont susceptibles de contracter la salmonellose.

On a trois types de symptômes de la salmonellose :

-Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes :

Sont provoquées par quatre sérovars de *Salmonella*, strictement humains, antigéniquement distincts mais de pouvoir pathogène similaire : *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A*, *Salmonella Paratyphi B* et *Salmonella Paratyphi C*. Les *Salmonella* sont ingérées avec une boisson ou un aliment contaminé. La dose infectante serait de l'ordre de 10⁵ bactéries.

Les symptômes apparaissent après une période d'incubation entre 10 à 15 jours, selon l'état physiologique de l'hôte, la durée des symptômes est de 1 à 7 jours, les signes cliniques observés sont ; une fièvre continue accompagnée de maux de tête, d'anorexie, d'abattement et de douleurs abdominales avec diarrhée ou constipation (**D'aoust, 1989**).

Les *Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes ayant l'homme pour seul réservoir, la contamination se fait par ingestion d'eau ou d'aliments ayant subi une contamination fécale d'origine humaine. Comme toutes les maladies à transmission oro-fécale, ces fièvres surviennent le plus souvent dans des zones où l'hygiène est précaire, et frappent principalement les pays en développement en Asie, en Afrique ou en Amérique Latine. Les données mondiales les plus récentes font état de 17 millions de cas annuels de fièvre typhoïde, et de 600 000 morts (**Hu and Kopecko, 2003**).

- Les gastro-entérites :

Sont provoquées par des *Salmonella* ubiquistes présentes chez l'homme et les animaux. La durée d'incubation est généralement de 1 à 2 jours et dépend de la dose ingérée, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de la souche de *Salmonella*. Les principaux symptômes de la salmonellose (infections non typhoïdiques) sont la diarrhée non sanglante, les douleurs abdominales, la fièvre, les nausées et des vomissements qui surviennent généralement 12-36 heures après l'ingestion. Chez des adultes de condition physique normale, une gastro-entérite disparaît sans traitement après 3 à 5 jours en moyenne. Le traitement employé repose essentiellement sur la réhydratation.

-Toxi-infections alimentaires collectives :

La consommation simultanée par plusieurs personnes d'un aliment massivement contaminé par des *Salmonella* «mineures» (*Salmonella typhi murium*, *S. enteritidis*, *S. dublin*, etc...) entraîne une cascade des cas de gastro-entérites, qui, simulant un véritable empoisonnement, est appelé toxi-infection alimentaire collective (TIAC). La période d'incubation est de 10 à 18 heures. Les troubles durent en général 2 à 5 jours. Les complications sont rares sauf chez les sujets à faibles moyens de défense (cf. gastro-entérites). L'aliment responsable est identifié

par enquête épidémiologique (enquête cas-témoin). Le diagnostic se fait par recherche de *Salmonella* dans les selles des malades et dans l'aliment incriminé (s'il est encore accessible).

Le traitement est le même que celui des gastro-entérites

La prévention repose essentiellement sur l'hygiène des cuisines collectives (détection des porteurs sains, techniques de préparation, techniques de conservation : « chaîne du chaud » ou « chaîne du froid », etc...).

(Avril et al., 1992).

I-B- Staphylococcus aureus : Agent pathogène dans les aliments :

I.B.1.Définition des Staphylococcus aureus :

Le *S. aureus* étant un organisme vivant procaryote et une bactérie à Gram positif, il se retrouve donc dans le règne *bacteriapuis* dans le phylum *firmicutes*. Sa taxonomie complète le positionne dans la classe des *Bacillipuis* dans l'ordre des *Bacilliales*. En 2001, les chercheurs Garrity et Holt ont proposé de radier les *S. aureus* de la famille des *Micrococcaceae* (genre *Micrococcus* et *Stomatococcus*) grâce l'analyse des séquences de la sous-unité 16S de l'acide ribonucléique ribosomique (ARNr 16S) ainsi que d'autres analyses génétiques. Sa position taxonomique est maintenant bien définie et il a une famille à son nom : *Staphylococcaceae*. Cette famille comporte les genres *Gemella*, *Jeotgalicoccus*, *Salinicoccus*, *Macrococcus*, ainsi que le plus important le genre *Staphylococcus*. On retrouve donc *S. aureus* dans le genre *Staphylococcus*.

(Dworkin,2006)

I.B.2.Caractéristiques bactériologiques :

I.B.2.1 : morphologie :

On retrouve les staphylocoques en amas irréguliers de bactéries ou regroupés par deux (diplocoques) ou par quatre (tétraèdres) .Ces petits amas forment souvent des grappes et c'est grâce à l'examen direct que la bactérie a été nommée par Ogston (1884). En effet, son nom dérive du grec «staphyle» qui signifie tout simplement grappe de raisin. Les staphylocoques ont été observés par

Robert Koch (1878) puis reconnus par Louis Pasteur (1880) et après une coloration de Gram, ils se révèlent être des cocci Gram positif, d'environ 0,5 à 1 µm de diamètre. Ils sont immobiles, non sporulés. La majorité des *S. aureus* sont capsulés mais ils peuvent perdre leur capsule après culture.(Kloos et al, 1976)



Figure 01: Coloration de Gram de *S. aureus*

Source : http://7staphylococcus-aureus.blogspot.fr/2007/11/diagnostico-laboratorio_14.html, novembre 2012.

1.B.2.2 :Morphologie des colonies de *S. aureus*

Le *S. aureus* est une bactérie à croissance aéro-anaérobie facultative, et sa croissance sur milieu ordinaire est facile entre 10 et 45 °C. Sur une gélose profonde en tube, les bactéries cultivent tout au long du tube donc le caractère aéro-anaérobie facultatif est confirmé. Après 24h d'incubation, il peut *S. aureus* se développe sur géloses trypticase-soja supplémentées ou non en sang. Les colonies observées sont alors lisses, opaques, convexes et rondes (à bord net). Leur diamètre est compris entre 1 et 3 mm et elles peuvent être pigmentées (Figure 02).

(Smith et al, 2001)

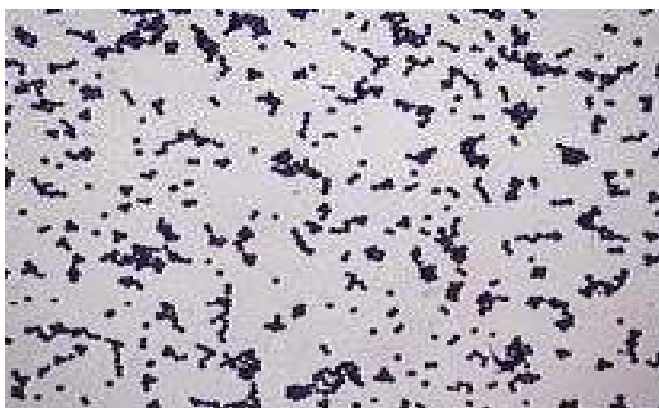


Figure 02: Culture de *S. aureus* sur gélose au sang

Source : <http://desbiol.univ-paris5.fr/B15-obs07/index.html>, consulté en novembre 2012.

1.B.3 Taxonomie :

Selon **Fauchère et al** en **2003** les staphylocoque sont classé comme suit :

Classe : Bacilli

Ordre : Bacillales

Famille : Staphylococcaceae

Genre : Staphylococcus

Espèce : *Staphylococcus aureus*

1.B.4 .Habitat

1.B.4.1 .Chez l'être vivant

La présence de réservoirs de *S. aureus* chez les hôtes humains et animaux est une réalité. En effet, *S. aureus* fait partie de la flore commensale normale des mammifères et des oiseaux. Chez l'homme, *S. aureus* est présent sur plusieurs sites corporels. On le repère sur la surface de la peau et des muqueuses, mais il colonise principalement les fosses nasales, les glandes de la peau, le cuir chevelu, les mains, la bouche, les dents et le périnée.

(Williams et al, 1963)

La colonisation de ce micro-organisme, n'induit pas forcément une pathologie puisqu'il existe des porteurs sains dans la population générale. La fréquence du portage sain chez les humains est approximativement de 30 %, cette fréquence diffère selon plusieurs paramètres comme par exemple le site de la colonisation 23 à 46 % au niveau du nez , 24 à 36 % au niveau de la bouche ou l'âge jusqu'à 64 % chez les enfants . *S. aureus* peut donc, à partir de ces réservoirs, infecter les lésions cutanées, les glandes mammaires et les muqueuses intestinales ou génitales (**Garland, SM et al , 2006**) .Certains facteurs de risque de portage de *S. aureus* ont été identifiés comme les phototypes blancs , le sexe masculin , les diabétiques , les insuffisants hépatiques , les personnes présentant des problèmes cutanés , les sujets séropositifs pour le VIH ou encore les personnes dialysées sont plus à risque d'être porteurs de la bactérie et de développer une infection.

(Waston et al , 2006)

1.B.4.2 .Dans les aliments et leur environnement de production :

La bactérie peut se retrouver dans les aliments comme par exemple, le lait, les produits laitiers ou la viande. La contamination des aliments peut être due principalement à la matière première qui est contaminée ou d'origine humaine lors de la fabrication et/ou le conditionnement de l'aliment dans l'industrie agro-alimentaire. Ces contaminations sont souvent liées à un défaut d'hygiène du matériel de production ou de l'employé.

(Nguyen et al ,1999)

La contamination des aliments est un problème à prendre en compte car *S. aureus* peut être responsable de toxi-infections alimentaires (TIA). S'il y a plusieurs personnes infectées par une toxi-infection alimentaire collective (TIAC), elles doivent impérativement se déclarer auprès des agences régionales de santé (ARS) ou de la direction départementale de la protection des populations (DDPP). En effet, les TIAC figurent en France dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (DO). Cette DO va être suivie d'une enquête épidémiologique afin d'identifier les aliments responsables et d'appliquer des mesures correctives pour éviter la survenue d'un nouvel incident. Les TIAC à *S. aureus* sont dues à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques.

(Yu et al , 1989)

1.B.5 :Pathogénicité :

La présence de *S. aureus* dans les aliments constitue un risque pour la santé humaine parce que certaines souches sont capables de produire des entérotoxines dont l'ingestion provoque une intoxication. Les symptômes apparaissent brutalement : nausées, douleurs abdominales et surtout vomissements violents et répétés souvent accompagnés de diarrhée. Il n'y a généralement pas de fièvre. Des complications peuvent survenir en fonction de la dose ingérée et de la sensibilité individuelle : déshydratation, prostration, hypotension, état de choc. Le rétablissement intervient dans les 24 à 48 h, sans séquelle. La mortalité est exceptionnelle.

(Edmiston et al , 2005)

Les entérotoxines staphylococciques sont de petites protéines thermostables alors que la bactérie est thermosensible. Plusieurs types immunologiques d'entérotoxines ont été décrits : les types A à E détectables par des méthodes immunologiques commercialisées, d'incidence connue, et les types G à M, récemment décrits, d'incidence inconnue. Le type A, seul ou en association avec d'autres types, est le plus fréquemment impliqué dans les toxi-infections collectives (TIAC).

L'aliment ne devient toxique que s'il est contaminé par des souches productrices d'entérotoxines et si des conditions favorables à une multiplication bactérienne importante et à la toxinogénèse

se trouvent réunies. La grande majorité des souches de *S. aureus* isolées d'aliments sont capables de produire une ou plusieurs entérotoxines en culture *in vitro*, mais à des niveaux de concentration très divers selon les souches et il n'est pas certain que des souches faiblement productrices puissent être impliquées dans une toxi-infection alimentaire.

(Callon, 2007)

I-C: Escherichia coli : agent pathogène des aliments :

1.C.1. Définition de *Escherichia coli* :

Les *Escherichia coli* font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des hôtes communs de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux).

La majorité des souches d'*E. coli* sont commensales, mais certaines ont toutefois été associées à des pathologies intestinales ou extra-intestinales .

(Levine, 1987)

Parmi celles-ci, les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont considérés comme des pathogènes émergents importants en santé publique. Ils peuvent être à l'origine de diarrhées souvent sanglantes. Dans certains cas, des complications peuvent apparaître telles qu'un syndrome hémolytique et urémique parfois mortel, notamment chez les enfants en bas âge, ou un purpura thrombotique thrombocytopénique chez l'adulte.

(Pohl , 1993).

I.C.2. Taxonomie

Règne : Procaryotes (ouprocaryotae)

Embranchement (phylum) :Gracilicutes

Classe :Scotobacteria

Famille :Enterobacteriaceae

Genre : Escherichia

Espèce : Escherichia coli

(Komacki et al ,1982)

1.C.3. Classification des *E. coli* responsables des troubles intestinaux :

A l'heure actuelle, il n'existe pas de classification standardisée des souches appartenant à l'espèce *E. coli*. Les médecins utilisent une classification basée sur la pathogénie des syndromes diarrhéiques comprenant 6 groupes (Figure 03):

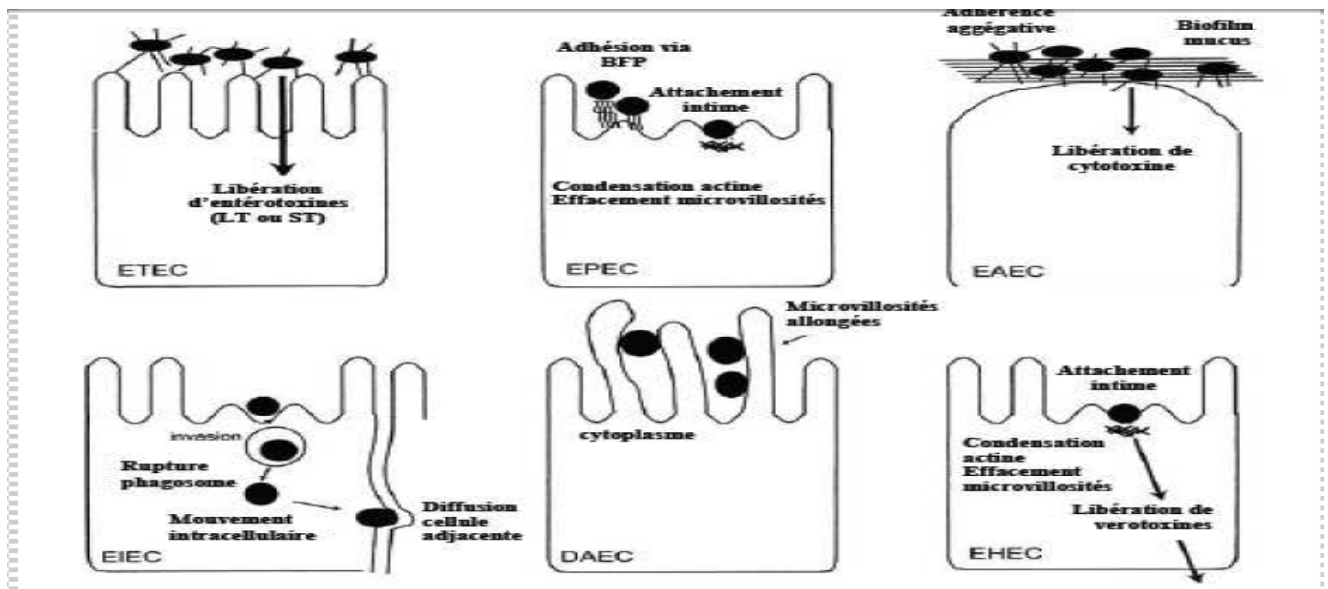


Figure 03 : Pathogénie associée aux six classes de *E. coli* responsables de diarrhées

(Nataro et Kaper, 1998)

I.C.4 .les catégories d'Escherichia coli pathogène :

➤ *E. Coli entérotoxigéniques (ECET)*

Les ECET sont une cause majeure de diarrhée aqueuse aiguë accompagnée souvent de déshydratation chez les enfants de moins de 3 ans (surtout dans les pays en voie de développement), et sont aussi responsables de ce que l'on appelle la « turista » ou « diarrhée du voyageur ». Ces souches sécrètent des toxines qui vont induire une diffusion osmotique (due à des différences de concentration) d'eau vers la lumière intestinale

➤ *E. Coli entéroinvasives (ECEI)*

Les ECEI conduisent à des syndromes dysentériques qui se traduisent par une forte fièvre, des crampes abdominales et des nausées, accompagnés d'une diarrhée aqueuse évoluant rapidement en une dysenterie (selles contenant du sang et du mucus). Les ECEI ne sécrètent pas de toxines : elles provoquent la mort cellulaire et déclenchent une intense réaction inflammatoire.

➤ **E. Coli entéropathogènes (ECEP)**

Les ECEP sont surtout responsables de gastro-entérites infantiles et ne sont normalement pathogènes qu'en dessous de l'âge de deux ans.

➤ **E. Coli entérohémorragiques (ECEH)**

Les ECEH sont responsables de colites hémorragiques. Elles ont notamment défrayé la chronique en 2011 à la suite d'une épidémie de diarrhées mortelles en Allemagne. Surnommées « les bactéries tueuses » par certains journalistes, elles sont les plus redoutées, car les symptômes induits sont particulièrement sévères. la période d'incubation va de trois à huit jours avec une durée moyenne de trois à quatre jours. La plupart des patients guérissent en 10 jours mais, pour une petite partie d'entre eux (surtout les enfants et les personnes âgées), l'infection peut évoluer vers une forme potentiellement mortelle, comme le syndrome hémolytique et urémique (SHU). Celui-ci se caractérise par une insuffisance rénale aiguë, une anémie hémolytique et une thrombopénie.

L'OMS estime que pour 10% des patients, l'infection peut évoluer en SHU, avec un taux de mortalité oscillant de 3 à 5 %. Elle laisse des complications neurologiques dans 25% des cas et des séquelles rénales chroniques chez 50% des survivants.

➤ **E. Coli entéroaggrégatives (ECEAgg)**

Ces types de souches présentent un mode d'action différent des quatre précédents : elles s'accrochent à la paroi intestinale en formant des « amas de briques ». Elles sont responsables de retards de croissance ainsi que de diarrhées persistantes.

(Germany ,1994)

I.C.5 .Habitat

E.coliest un commensal du tube digestif de l'homme et de nombreux animaux. Il représente à lui seul la plus grande partie de la flore bactérienne **aérobie** de l'intestin (espèce aérobie **dominante**) à raison de 10⁸ par gramme de fécès (flore totale : 10¹¹ à 10¹² bactéries par gramme).

(Anonyme 2003)

I.C.6 .La transmission

La transmission des E. coli est essentiellement liée à la contamination de produits alimentaires. La contamination des aliments peut se produire soit lors de la fabrication en usine (suivie de la multiplication éventuelle lors du transport et du stockage), soit lors de la préparation du repas (personnel des cuisines). La contamination interhumaine existe également par l'intermédiaire de porteurs sains avec une faible dose infectante.

(Padye et al ,1991).

II – La PCR en temps réel :

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR.

(KAPLAN et al ,1989)

II.1.Historique :

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device). Une augmentation de l'émission de la fluorescence était observée lorsque le bromure d'éthidium se fixait à l'ADN double brin produit au cours de l'amplification. En traçant l'augmentation de l'émission de fluorescence en fonction du nombre de cycles, le système produit des courbes d'amplification exhibant un schéma plus complet du processus de la PCR que la simple détermination d'amplicons (produits d'amplification) accumulés en fin d'amplification

(Higuchi et al, 1992).

II.2.Définition :

La PCR quantitative en temps réel est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés.

(GAUTIER et al , 2002)

II.3. Principe de la PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur le même principe que la PCR classique, le procédé nécessite la succession de nombreux cycles avec trois étapes (dénaturation, hybridation, élongation) excepté qu'on utilise une sonde en plus des deux amorces. La *figure 4* présente le principe de la PCR quantitative en temps réel avec utilisation d'une sonde TaqMan. Une sonde TaqMan est un oligonucléotide complémentaire de l'un des brins de la séquence cible, à laquelle elle s'hybride pendant la phase d'hybridation, de même que les amorces (*figure 4*). Elle porte à

son extrémité 5' une molécule fluorescente (fluorochrome) dite « reporter », et à son extrémité 3' un deuxième fluorochrome dit « quencher ». Le « reporter » est une molécule qui, après excitation par un faisceau laser, émet un signal de fluorescence à une longueur d'onde spécifique qui est mesuré à la fin de chaque cycle de PCR. En absence d'amplification, la sonde reste intacte, le fluorochrome « quencher » inhibe en grande partie la fluorescence du « reporter », et seule une fluorescence résiduelle est émise .

(FÖRSTER , 1948)

En revanche, s'il y a amplification, la sonde TaqMan est hydrolysée lors de l'étape d'élongation de l'ADN (activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase) .

(HOLLAND et al, 1991)

Le «reporter » est alors libéré et sa fluorescence n'est plus inhibée par celle du « quencher ». Pour chaque échantillon, l'émission de fluorescence enregistrée à la fin de chaque cycle de PCR permet de définir une valeur de Ct (cycle threshold ou cycle seuil) correspondant au nombre de cycles de PCR à partir duquel la valeur de l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond.

La valeur du Ct est d'autant plus faible que le nombre initial de copies de la séquence cible est grand : elle est inversement proportionnelle au logarithme du nombre initial de copies de la séquence cible dans l'échantillon d'ADN .

(HIGUCHI et al, 1993).

II.4. les systèmes de détection en temps réel

Les systèmes permettant la détection des molécules d'amplicon générées après chaque cycle d'amplification font appel :

- ✓ **soit à un agent intercalant** : se fixant directement sur l'ADN double brin

Le système de détection le plus simple repose sur l'inclusion d'un agent intercalant, le SYBRTM Green I qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé.

(Wittwer &al. ,1997)

À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBRTM Green I s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'il est excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR.

(Higuchi&al. ,1997)

- ✓ **soit à une sonde fluorogénique** allant s'hybrider de manière spécifique sur le fragment cible amplifié.
- **Principe de base : quenching par FRET**

Une sonde fluorogénique est un fragment d'ADN monobrin, non extensible par l'ADN polymérase, spécifique du fragment cible amplifié et portant un ou deux groupements fluorophores.

Un groupement fluorophore est une molécule capable d'absorber de l'énergie lumineuse et ainsi de passer à un état excité, puis de restituer cette énergie sous forme d'une émission fluorescente en retournant à son état initial.

(Clegg, 1995).

À chaque cycle d'amplification PCR, l'hybridation spécifique d'une molécule de sonde fluorogénique sur chaque molécule d'amplicon générée, couplée à une mesure de l'intensité de la fluorescence émise par le groupement fluorophore excité, vont permettre le suivi en direct de la réaction d'amplification. Cependant, l'émission de fluorescence mesurée ne doit se produire que lorsque la sonde s'est hybridée sur sa cible spécifique. D'où l'introduction d'un second fluorophore allant plus ou moins complètement absorber l'énergie émise par le fluorophore excité et réduire voire empêcher l'émission de fluorescence lorsque la sonde se trouve libre dans le milieu réactionnel. Afin d'obtenir un signal intense avec un très faible bruit de fond, le système permettant la détection des produits d'amplification exploite le processus de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET : *fluorescence resonance energy transfer*) entre une molécule électroniquement excitée (le fluorophore donneur) et une molécule voisine (le fluorophore accepteur ou quencher)

Suite à ce transfert d'énergie, le fluorophore donneur excité retourne à son état initial et l'énergie transférée au quencher est, soit absorbée par ce dernier, soit dissipée dans l'environnement sous forme de chaleur. Ce processus de capture et de transfert d'énergie lumineuse est appelé *quenching*. Le fluorophore *quencher* est la molécule qui réalise le *quenching* de fluorescence.

(Glazer et al. ,1997)

- **Deux conditions sont essentielles pour obtenir un quenching efficace par FRET :**
 - un chevauchement spectral compatible du couple donneur/accepteur et un rayon dit de Förster (distance optimale entre donneur et accepteur) compris entre 40 et 100 angströms.

(Livak et al ,1995)

- Selon la nature du *quencher* participant au processus FRET, plusieurs systèmes de détection ont été élaborés. À l'heure actuelle, les stratégies de détection les plus employées sont celles utilisant comme sonde fluorogénique, les sondes TaqMan™ ou sondes d'hydrolyse les sondes FRET en tandem ou sondes LightCycler™ (**Nazarenko et al. ,1997**), les sondes Beacon™ , autres systèmes comme le système Scorpion™ , le système Amplifluor™ (**Caplin et al. ,1999**), le système des sondes peptidiques *light-up* ou sondes peptide nucleic acids (PNA) (récemment développés) (**Svanvik et al , 2000**)

- **Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman™**

La sonde TaqMan™ est un fragment oligonucléotidique marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorophore donneur qui est un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX ou VICTM). À l'extrémité 3', se trouve le fluorophore *quencher* qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA). Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores, liée à la petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides, soit moins de 55 angströms entre les deux fluorophores), l'énergie absorbée par le fluorophore donneur excité est transférée par FRET au fluorophore accepteur. Le spectre d'excitation du TAMRA ne chevauchant pas le spectre d'émission du fluorophore donneur, le *quencher* absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence.

La particularité du système TaqMan™ est d'exploiter l'activité 5'-3' nucléase de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces .

(Holland et al , 1991)

Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le fluorophore donneur de l'effet *quenching* exercé par le TAMRA et ainsi de rétablir son émission de fluorescence .L'intensité de la fluorescence émise par le

fluorophore donneur, couramment dénommé fluorophore reporter dans une sonde TaqManTM, est mesurée en fin de chaque cycle d'amplification.

De par son mode de fonctionnement, le système TaqManTM utilise des conditions d'amplification particulières en deux étapes, une étape de dénaturation à 94 °C et une seconde étape combinant hybridation et élongation réalisées à une température identique (aux alentours de 60 °C). La sonde ne pouvant être clivée que lorsqu'elle est hybridée à son brin complémentaire, la température d'extension des amorces doit être compatible avec la température d'hybridation de la sonde.

La T_m d'une sonde TaqManTM doit donc être élevée et voisine de 70 °C, ce qui impose une conception rigoureuse des amorces mais facilite l'application d'un profil de thermocyclage standard.

Par ailleurs, le système Taq- ManTM impose l'utilisation d'une ADN polymérase obligatoirement dotée d'une activité 5'-3' exonucléase dont l'efficacité conditionnera la qualité et l'intensité du signal émis .

(Kreuzer et al , 2000)

Le clivage de la sonde étant irréversible, le système TaqManTM ne permet pas l'établissement d'une courbe de fusion post-PCR. Le développement d'un nouveau type de sondes Taq-ManTM, les sondes TaqManTM – MGB , a permis de pallier certaines limites du système TaqManTM.

L'introduction à l'extrémité 3' d'une molécule ayant une affinité pour le petit sillon de l'ADN ou noyau MGB (*minor groove binder*) augmente la T_m de la sonde et stabilise plus fortement son interaction avec la matrice ADN, ce qui permet de dessiner des sondes de plus petite taille (13 à 20 nucléotides) et capables de s'hybrider avec une matrice riche en dinucléotides GC ou AT. Par ailleurs, dans une sonde Taq- ManTM – MGB, le fluorophore reporter est associé à un *quencher* fluorescent ; ce qui rend possible la détection de deux cibles différentes (ou *biplexing*) au cours d'une même réaction PCR. Ces modifications chimiques apportées aux sondes TaqManTM ont également permis d'étendre les applications de cette chimie au génotypage par discrimination allélique.

(Kutyavin et al , 2000)

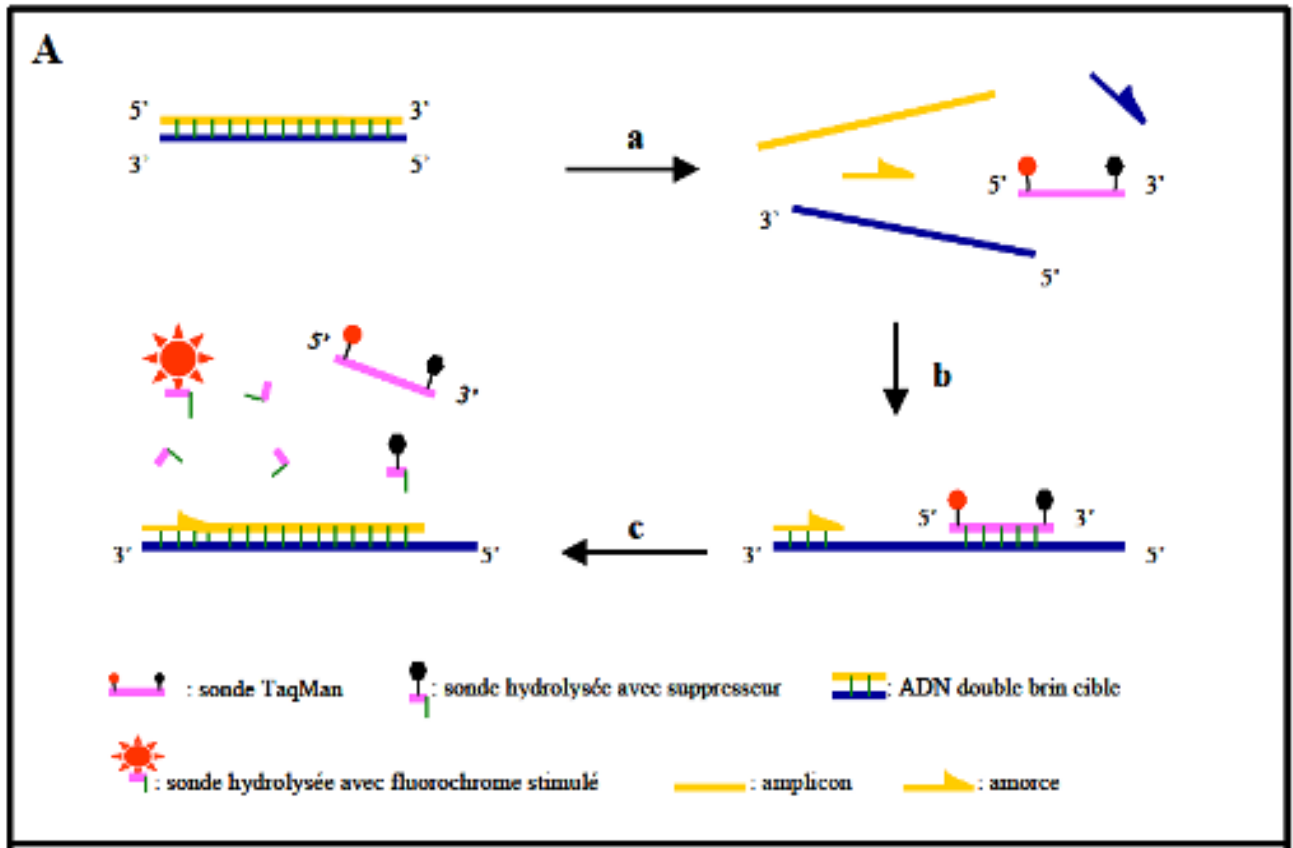


Figure 04 : Principe de la PCR quantitative en temp réel associer à la chimie TaqMan

(Livak KJ et al.1995)

II.5. Le suivi en temps réel d'une réaction PCR :

La cinétique de la réaction PCR met en jeu en trois phases :

Une phase d'initiation ou La phase de bruit de fond :

elle s'achève lorsque le nombre de produits PCR néo formés dépasse la valeur seuil de la technique de détection utilisée.

➤ Cycle seuil Ct (Threshold cycle) :

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction . Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond

(Gibson et al, 1996).

Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues

(Bustin, 2000).

Une phase exponentielle :

La réaction en chaîne qui s'établit par la répétition des cycles de dénaturation-hybridation-élongation aboutit à une accumulation exponentielle théorique de 2^n fois par molécule d'ADN. Autrement dit, la quantité de produits de PCR double à chaque cycle d'amplification suivant la relation mathématique suivante :

$$N = N_0 \cdot 2^n$$

(où :N est le nombre de molécules amplifiées au final, N_0 le nombre initial de molécules et n le nombre de cycles d'amplification).

(Tse et al.,2003)

Une phase plateau :

L'accumulation exponentielle de la quantité de produits au cours de la réaction PCR n'est, en réalité, observée que pendant les 20 à 35 premiers cycles. Au cours des derniers cycles d'amplification, l'accumulation se ralentit et la quantité de produits formés tend vers une limite. C'est l'effet plateau (ou saturation). La phase plateau reflète une baisse de l'efficacité d'amplification qui résulte en partie de

l'inactivation thermique partielle de l'ADN polymérase au cours des derniers cycles et du fait que les produits nécessaires à l'amplification (notamment dNTP et amorces) deviennent limitants. D'autres phénomènes sont également impliqués : réhybridation préférentielle de la cible avec elle-même plutôt qu'avec les amorces, activation de l'activité 5'-3' exonucléase de l'ADN polymérase et probablement accumulation de pyrophosphates résultant de la dénaturation thermique des dNTP et inhibiteurs de l'activité polymérase initialement présente dans l'échantillon.

(Morrison et al. , 1994)

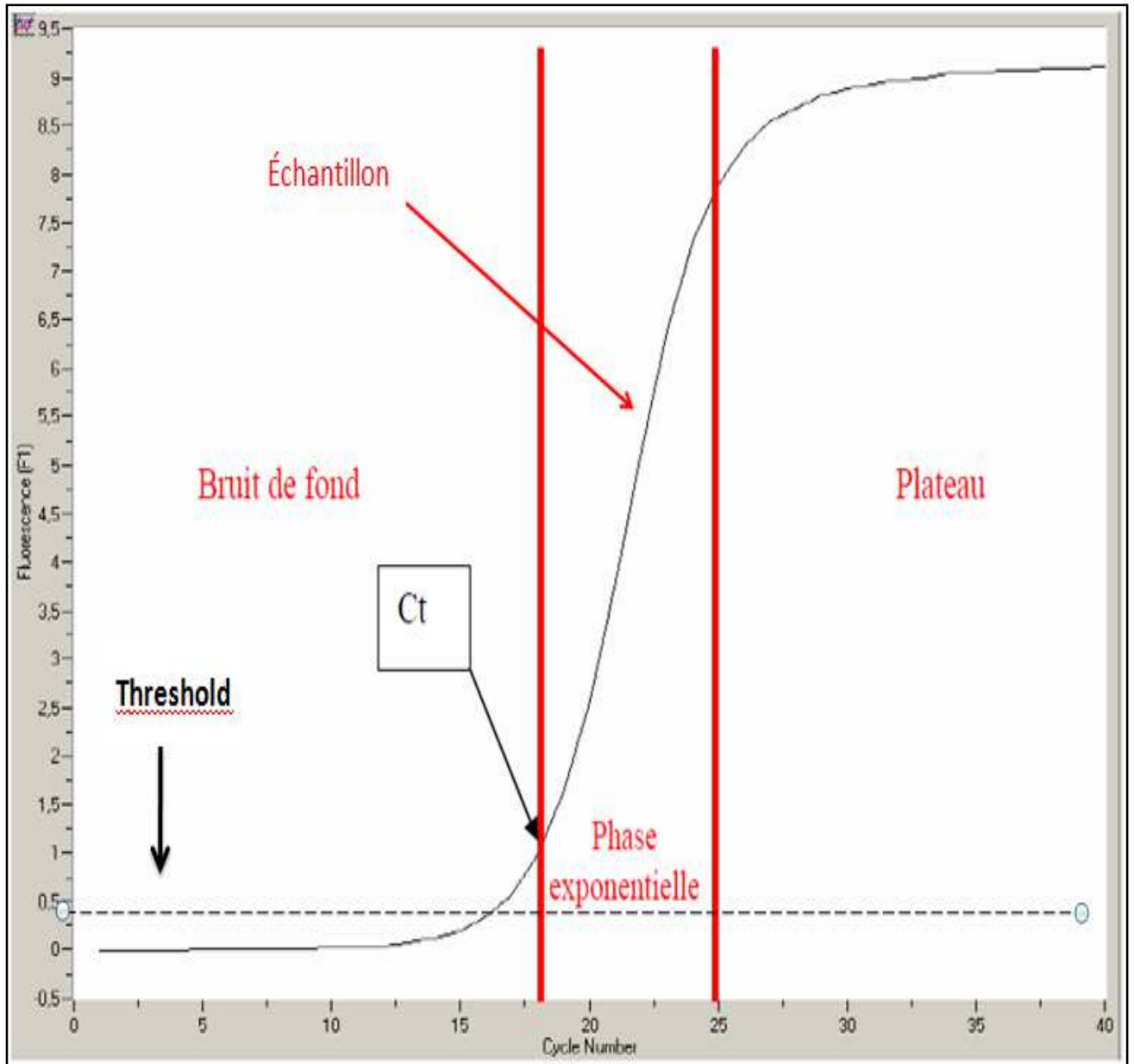


Figure 5 : les trois phases de la réaction PCR

Source : <http://www.gene-quantification.info/The Reference in qPCR & dPCR - Academic & Industrial Information Platform>

II.6.Application :

La technologie de PCR en temps réel a grandement amélioré et simplifié la quantification des acides nucléiques.

Elle est aujourd'hui devenue un outil inestimable pour de nombreux scientifiques. En biologie médicale, les applications sont déjà très nombreuses et couvrent des domaines très diversifiés dont les plus importants se situent en microbiologie clinique, en oncologie et dans l'étude de l'expression des gènes. Des applications très importantes ont également été développées en microbiologie alimentaire et en agroalimentaire.

Microbiologie clinique :

La détection et la quantification d'agents pathogènes bactériens (mycobactéries, légionelles, mycoplasmes, *Bordetellapertussis*, *Chlamydia*) et fongiques (champignons du genre *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*) par PCR en temps réel a fait l'objet de plusieurs centaines de publications scientifiques, cet intérêt s'expliquant par la durée du diagnostic traditionnel qui s'exprime en jours voire en semaines et par la grande sensibilité de cette technique par rapport aux méthodes conventionnelles.

La PCR quantitative en temps réel s'est également révélée un grand intérêt pour la titration de virus (virus VIH1 et VIH2 du sida, virus VHB etVHC des hépatites B et C) dans les phases précoces de la maladie, mais aussi dans le suivi des sujets infectés et en particulier le suivi des traitements antiviraux.

C'est dans ce domaine que la connaissance du nombre « absolu » de particules virales est utile. Des trousse de quantification « absolue » dédiées à la quantification d'une charge virale et utilisant des standards internationaux OMS (Organisation mondiale de la santé) calibrés ont été récemment commercialisées.

Les applications de la PCR en microbiologie clinique présentent cependant des limitations importantes à considérer :

1) la plupart des agents infectieux sont caractérisés par une grande variabilité génétique susceptible d'affecter de façon significative l'estimation de la charge en agents pathogènes, d'où la nécessité de développer des essais spécifiques de sous-classes

2) le risque de résultats faussement positifs par contamination mais aussi de résultats faussement négatifs liés à la présence d'inhibiteurs de PCR dans le liquide biologique considéré impose l'utilisation d'un contrôle interne positif qui sera analysé en parallèle pour chaque échantillon.

(Niesters , 2001)

Oncologie clinique :

Les applications sont très nombreuses, les principales étant :

1) la quantification des transcrits de fusion, comme BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique, avant ou après autogreffe ou pour évaluer la réponse au traitement

2) la quantification des transcrits de fusion TELAML1 spécifiques de la leucémie aigüe lymphoblastique pour prédire une rechute ou évaluer la maladie résiduelle minimale

(Ginzinger , 2002)

3) la quantification d'oncogènes comme le gène HER-2/neu, l'amplification génique étant un critère de sélection pour une indication de thérapie ciblée par l'Herceptin® (anticorps monoclonaux anti-HER-2/neu) chez les patientes atteintes d'un cancer du sein métastatique

(Bernard et al , 2002)

Expression génique :

Les techniques de quantification relative par RT-PCR en temps réel sont largement utilisées pour :

1) estimer le niveau d'expression de gènes d'intérêt comme les gènes de cytokines par exemple

(Giulietti et al. , 2007)

2) analyser l'expression des variants d'épissage génique

3) et plus récemment valider les profils d'expression obtenus à l'aide des puces à ADN .

(Rajeevan et al. , 2001)

PARTIE PRATIQUE

II-Matériels et méthodes**II.1.Matériel****II.1.1.Matériel biologique :**

On a analysé 42 échantillons alimentaires comprenant à la fois des aliments crus et des aliments prêt-à-manger (10 viandes, 10 abats de poulet crus, 12 lait crus, 10 camemberts) provenant des plusieurs points de ventes réparties sur le territoire algérien. Les échantillons prélevés sont transportés au laboratoire dans une glacière contenant un nombre suffisant de sachets réfrigérants. Les unités d'échantillonnage ont été conservées au réfrigérateur (0°C et 4°C) et analysées dans les 24 heures suivant leur réception.

II.1.2.Liste des kits PCR utilisés**II.1.2.1. DNeasy® mericon® Food Handbook****Tableau N°02 : Contenu du kit :**

| | |
|------------------------------------|--------------|
| DNeasy mericon Food Kit | (50) |
| Catalog no. | 69514 |
| Number of preps | 50 |
| Food Lysis Buffer | 4 x 200 ml |
| Proteinase K | 1.4 ml |
| QIAquick [®] Spin Columns | 50 |
| Buffer PB | 2 x 30 ml |
| Buffer AW2, concentrate | 13 ml |
| Buffer EB | 15 ml |
| Handbook | 1 |

II.1.2.2 : Le kit mericon PCR kit S.Aureus (24)**Tableau N°03 :Contenu du kit (S aureus 24) :**

| | |
|---|-------------------|
| (PCR essay) | Tube jaune |
| (Multiplex PCR ou master mix) «il contient : DNTP, sondes Taq polymérase | Tube bleu |
| (contrôle positif) | Tube rouge |
| (Quantitectnucleicacid) Dilution Buffer | Tube noir |

Tableau N°04 : Contenu du kit (Sallmonella spp 24) :

| | |
|---|-------------------|
| (PCR essay) | Tube jaune |
| (Multiplex PCR ou master mix) «il contient : DNTP, sondes Taq polymérase | Tube bleu |
| (contrôle positif) | Tube rouge |
| (Quantitect nucleic acid) Dilution Buffer | Tube noir |

II.2.Méthodes**II.2.1. Analyse microbiologique classique****II.2.1.1. Analyse microbiologique de viande****II.2.1.1.a.préparation de la solution mère et des dilutions :**

Pour la préparation de la solution mère, prélever 25g de l'échantillon de viande broyé et l'introduire dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE (Tryptone Sel Eau) on obtient la dilution 10^{-1} .

Pour la préparation de la dilution 10^{-2} faire introduire 1ml de la solution mère 10^{-1} aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique stérile, procède de la même façon pour réaliser les autres dilutions.

II.2.1.1.b. Recherche de salmonella**Mode opératoire :**

La recherche de salmonelle s'effectue en quatre étapes successives :

II-2-1-1-b.1 : Pré enrichissement et enrichissement d'échantillon :**Pré enrichissement**

- Introduire aseptiquement 25g de viande broyée dans un flacon stérile contenant 225ml de EPT (eau peptonée tomponée), bien homogénéiser et incuber à 37°C pendant 18 à 24h.

Enrichissement

- Ensemencer 10 ml de la solution de pré enrichissement dans 10ml de bouillon SFB (D/C) au quelle on ajoute deux disque d'additif de SFB.

- Après homogénéisation, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24h.

II-2-1-1-b-2 : isolement de bactérie salmonella

Ensemencer en surface 0.1ml à partir de tube d'enrichissement (SFB) sur une gélose Hektoen et incuber pendant 24h à 37°C.

Lecture :

Les colonies apparaissent de couleur verte avec ou sans un centre noir (production de H₂S).

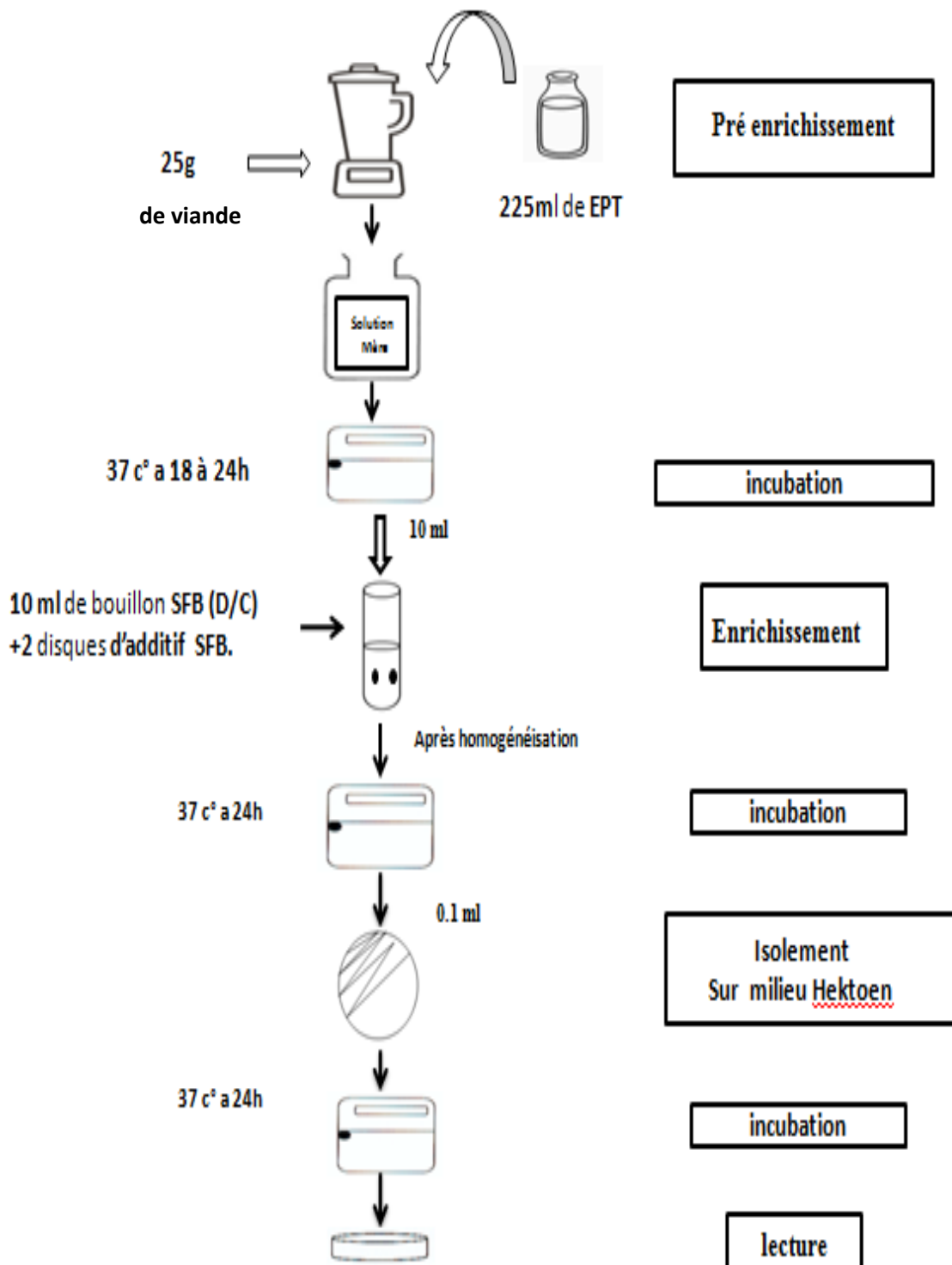


Figure 6: enrichissement et isolement de salmonella

II-2-1-1-b-3 : identification de bactérie salmonella :

Se fait à l'aide d'une galerie biochimique API 20E, un système standardisé pour l'identification des ENTEROBACTERIACEAE et des bacilles à gram négatif comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés.

II.2.1.2 : Analyse microbiologique des abats de poulet crus :**II.2.1.2.a. préparation de la solution mère et des dilutions :**

Pour la préparation de la solution mère, prélever 25g des abats broyés et l'introduire dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE (Tryptone Sel Eau) on obtient la dilution 10^{-1} .

Pour la préparation de la dilution 10^{-2} faire introduire 1ml de la solution mère 10^{-1} aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique stérile, procède de la même façon pour réaliser les autres dilutions.

II.2.1.2.b. Recherche de Staphylococcus aureus :

La recherche de Staphylococcus aureus dans un produit alimentaire se fait en 2 étapes

I.2.1.2.b.1. Première étape : Enrichissement

- Introduire aseptiquement 1ml de chaque dilution décimale dans des tubes à essai contenant 9ml de bouillant Giolitti contoni additionné de télurite de potassium, puis homogénéiser et incuber à 37°C pendant 24h.

Lecture : le tube ayant virés à la couleurs noire sera présumé positif.

II.2.1.2.b.2. Deuxième étape : Isolement

À partir de tube présumé positif, un isolement est réalisé par ensemencement en stries de 0.1ml sur des boites de Pétri contenant la gélose Chapman et incuber à 37°C pendant 24 à 48h

Lecture:

Staphylococcus aureus se présente sous formes de colonies de taille moyenne, lisses brillante pigmentées en jaunes du à la fermentation du mannitol avec une production d'acide.

Pour confirmer que ces colonies sont des Staphylococcus aureus, on procède au test biochimique suivant :

- Test de coagulase : à l'aide de plasma de lapin.

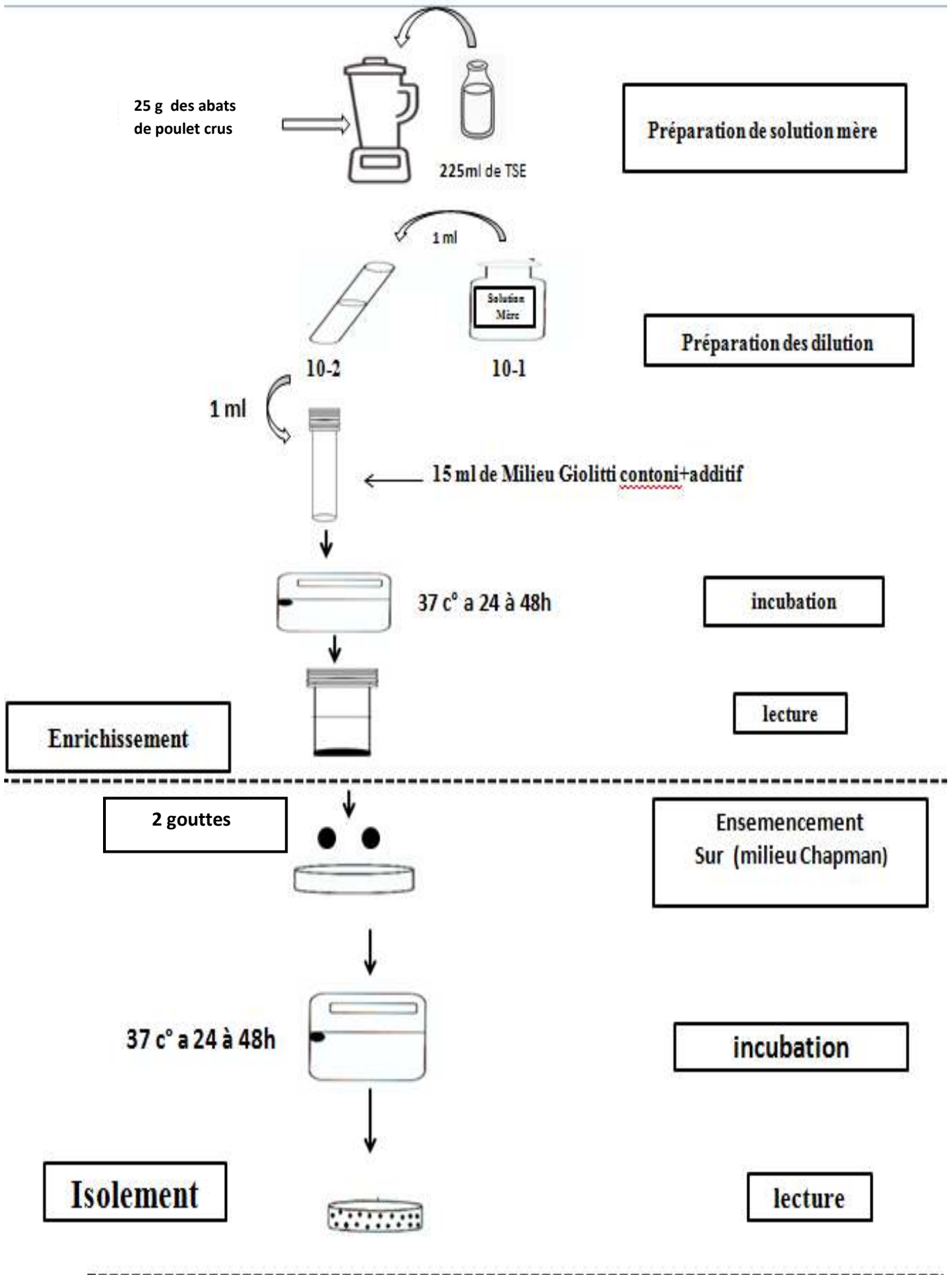


Figure 7: enrichissement et isolement des sataphylocoques pathogène

II.2.1.2.b.3.Troisième étape Identification**Principe :**

La staphylocoagulase ou coagulase est une enzyme thermostable libre, extracellulaire capable in vitro de coaguler le plasma de lapin.

La mise en évidence de la coagulase libre permet la différenciation des espèces du genre *Staphylococcus*. En effet, seule l'espèce *Staphylococcus aureus* peut posséder cette enzyme qui joue un rôle important dans le pouvoir pathogène de la bactérie.

Technique :

- ensemencer 5 colonies bien isolées sur un milieu Chapman dans 5ml du (BHIB)
- Incuber à 37°C pendant 3h
- introduire dans un tube à hémolyse 10 gouttes (0.5ml) de plasma de lapin oxalaté et 10 gouttes de bouillon précité.
- Incuber à 37°C pendant 16 à 24h

Lecture :

Les souches de *Staphylococcus aureus* provoquent la coagulation du plasma en un temps variant d'une demi- heure à 24h, un caillot moins compact visible avant 24ème heure doit être considéré comme positif.

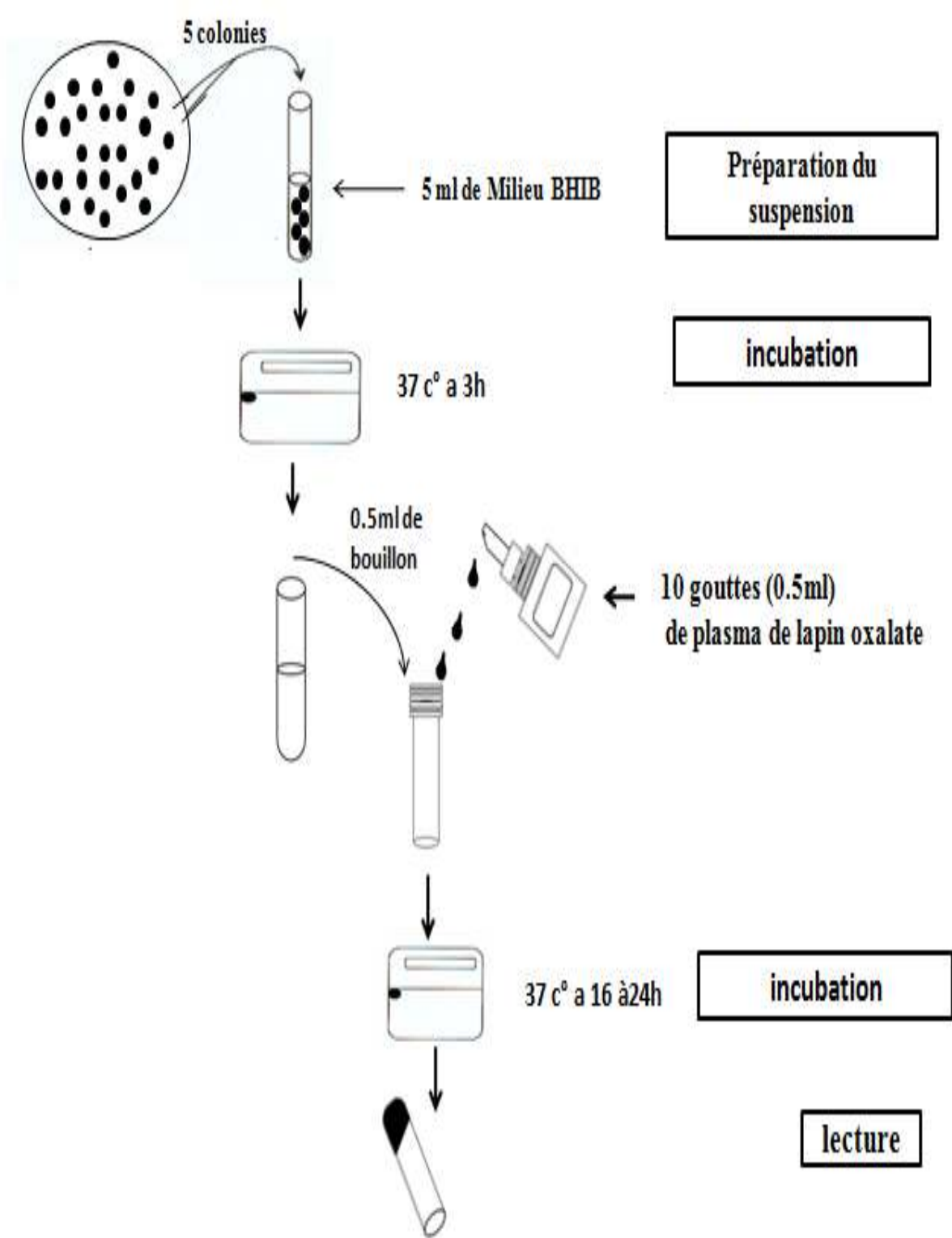


Figure 8 : technique de recherche de staphycoagulase

II.2.1.2.c. Recherche de salmonella:

* **Mode opératoire (voir le protocole précédant)**

II.2.1.3- Analyse microbiologique de camembert**II.2.13.a préparation de la solution mère et des dilutions :**

Pour la préparation de la solution mère, prélever 25g du camembert broyé et l'introduire dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE (Tryptone Sel Eau) on obtient la dilution 10^{-1} .

Pour la préparation de la dilution 10^{-2} faire introduire 1ml de la solution mère 10^{-1} aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique stérile, et procéder de la même façon pour réaliser les autres dilutions.

II.2.1.3.b. Recherche d'E.coli :**II.2.1.b.1: techniques d'isolement des bactéries pathogènes (E.coli ;)**

-**L'ensemencement** de chaque dilution est réalisé en surface sur des boites contenant le milieu (PTX), puis incubé à 44 °C. La lecture se fait après 24 h

-**Incubation** à 44 c° pendant 24 heures.

Lecture

Apparition des colonies de couleur bleu signifie la présence d'E. coli (**Pitt et al. 1997**).

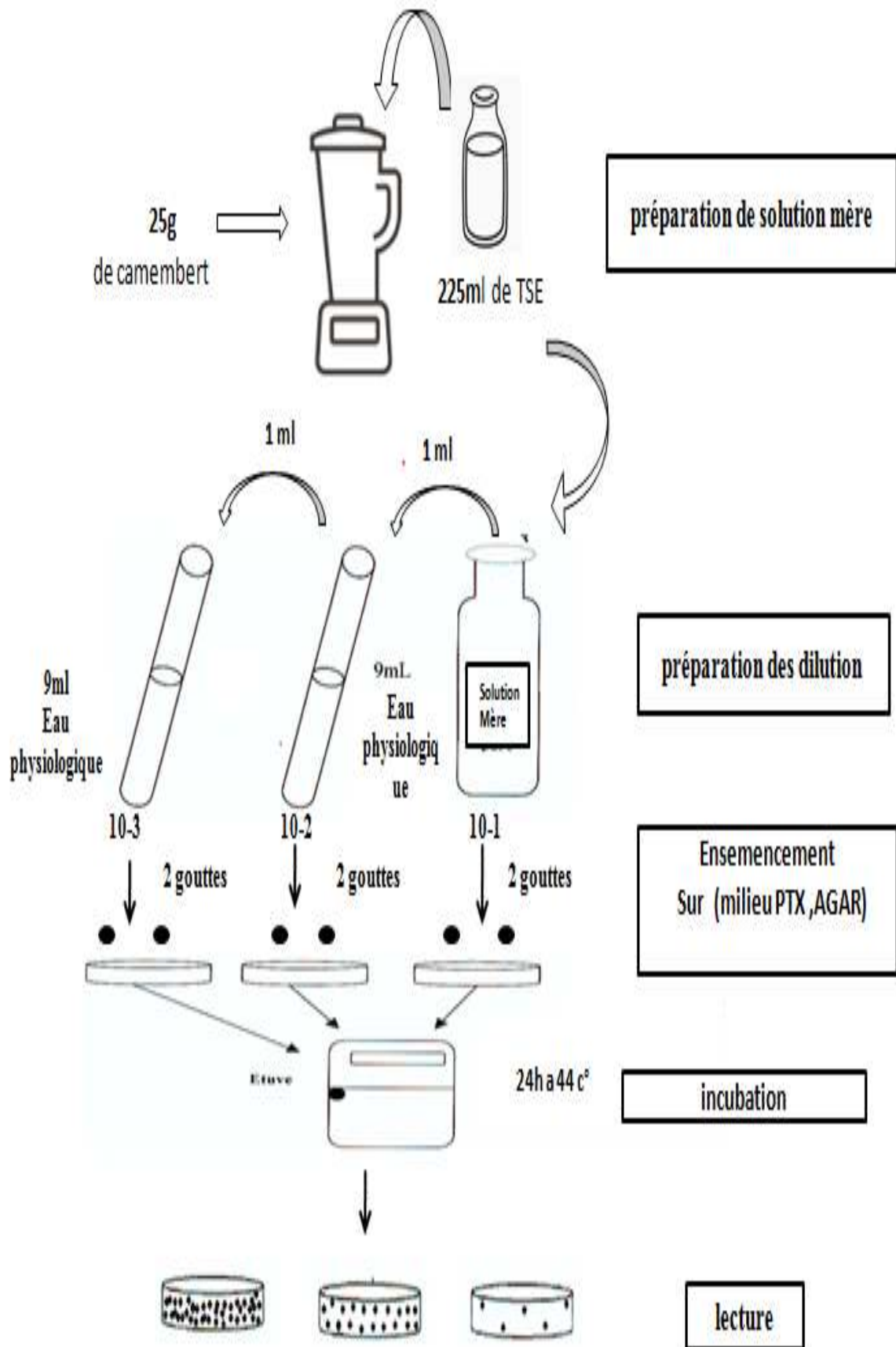


Figure 9: Préparation des dilutions d'échantillon du camembert et ensemencement

II.2.1.3.c. Recherche de Staphylococcus aureus :

*** Mode opératoire (voir le protocole précédant)**

II.2.1.4. Analyse microbiologique du lait cru :**II.2.1.4.a préparation de la solution mère et des dilutions :**

Pour la préparation de la solution mère, prélever 25 ml de lait homogénéisé et l'introduire dans un flacon stérile contenant 225 ml de TSE (Tryptone Sel Eau) on obtient la dilution 10^{-1} .

Pour la préparation de la dilution 10^{-2} faire introduire 1ml de la solution mère 10^{-1} aseptiquement dans 9ml d'eau physiologique stérile et procéder de la même façon pour réaliser les autres dilutions.

L'analyse a été effectuée sur les échantillons du lait cru prélevés sur trois points différents (point A, Point B et point C).

I.2.1.4.b. Recherche de Staphylococcus aureus :

*** Mode opératoire (voir le protocole précédant)**

I.2.1.4.c. Recherche d'Escherichia coli

*** Mode opératoire (voir le protocole précédant)**

II.2.2. Analyse génétique :

II.2.2-1 .L'extraction d'ADN :

- **Protocole standard: (200 mg)**

Ce protocole est conçu pour l'extraction de l'ADN total à partir d'un échantillon à petite échelle (200 mg) de matières premières ou transformées.

1. Prélever 200 mg à partir de 100 g d'échantillon du produit alimentaire homogénéisé à analyser et les introduire dans un tube de micro-centrifugeuse de 2 ml; Ajouter 1 ml de **tampon de lyse alimentaire** et 2,5 µl de solution de **protéinase K** et 30 µl d'**éthanol**. Vortex brièvement pour assurer une distribution complète et l'humidification du matériau d'échantillon.

2. Incuber dans un bain marie pendant 30 min à 60 ° C avec une agitation chaque 10 minute pour améliorer la précipitation de l'inhibiteur, refroidir l'échantillon à température ambiante (15-25 ° C) sur de la glace après incubation.

3. Centrifuger pendant 5 min à 2500 x g.

4. Pipeter 500 µl de **chloroforme** dans un tube de micro centrifugeuse de 2 ml.

5. Dessinez soigneusement le volume maximal de surnageant clair de chaque tube de lyse de l'étape 3 sans perturber le précipité de l'inhibiteur au fond du tube. Mélanger les parties aliquotes surnageantes dans un tube de micro centrifugeuse et mélanger en pipetant vers le haut et vers le bas plusieurs fois pour assurer une solution homogène.

6. Transférer 700 µl du pool de surnageant transparent au tube de micro centrifugeuse contenant du chloroforme.

7. Vortex le tube à microcentrifugeuse de l'étape 6 vigoureusement pendant 15 s et centrifugez à 18 000 tour pendant 15 min.

Remarque: Si le surnageant n'est pas clair, centrifuger à nouveau pendant 5 min.

8. Pipeter 350 µl de **tampon PB** dans un tube de microcentrifugeuse de 2 ml frais, ajouter 350 µl de la phase aqueuse supérieure à partir de l'étape 7 et bien mélanger par vortex.

9. Pipeter la solution de l'étape 8 dans la colonne de rotation QIAquick placée dans un tube de collecte de 2 ml. Centrifuger à 13000 tour pendant 2 min et jeter l'écoulement. Réutilisez le tube de collecte à l'étape 10.

10. Ajouter 500 µl de **tampon AW2** à la colonne de rotation QIAquick, centrifuger à 13000 tour pendant 2 min et éliminer l'écoulement. Réutiliser le tube de collecte et centrifuger à nouveau à 17 900 x g pendant 1 min pour sécher la membrane.

11. Transférer la colonne de rotation QIA quick à un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml ou 2 ml (non fourni) et pipeter 150 µl de **tampon EB** directement sur la membrane QIAquick. Incuber pendant 1 min à température ambiante (15-25 ° C), puis centrifuger à 13000 tour pendant 2 min pour éluer.

Les tampons utilisés pour extraction et purification de l'ADN



I.2.2-2 .L'amplification et l'identification des bacteries :

I.2.2-2.a .L'amplification et l'identification des staphylococcus aureus par PCR en temp réel dans l'échantillon des abats de poulet crus:

-Manuel mericon PCR kit S.Aureus (24)

- **Introduction**

Le kit **mericon PCR kit S.Aureus (24)** est une solution hautement spécifique et sensible servant à détecter l'ADN de staphylococcus aureus dans les aliments, les aliments d'origines animales et dans les produits pharmaceutiques.

Le protocole inclut la préparation d'une culture d'enrichissement suivie d'une purification manuelle ou automatisée de l'ADN d'espèces de staphylococcus aureus de même qu'une analyse de PCR en temps réel permettant de déterminer la présence ou l'absence de pathogènes à l'aide du test **mericon PCR kit S.Aureus (24)** d'espèces de staphylococcus aureus sur le Rotor-Gene® Q.

- **Principe**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est décelé au moyen de fluorophores. Ceux-ci sont généralement liés à des sondes oligonucléotidiques qui se lient spécifiquement au produit amplifié. La surveillance des intensités de fluorescence pendant l'analyse PCR (c.-à-d. en temps réel) permet la détection de l'accumulation de produit sans avoir à rouvrir les tubes de réaction par la suite.

Le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ADN de **staphylococcus aureus**, y compris un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle interne. L'ADN de contrôle interne assure la réussite de la purification et de l'amplification des tests en intégrant la procédure de purification de l'ADN.

Le kit utilise deux combinaisons amorce/sonde spécifiques l'une pour l'ADN de **staphylococcus aureus** générant une fluorescence FAM™ et l'autre pour le contrôle interne générant une fluorescence MAX™.

Le contrôle positif contient de l'ADN de **staphylococcus aureus** et sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel.

- **Extraction d'ADN**

Le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** peut être utilisé pour la détection de l'ADN de **staphylococcus aureus** dans les aliments, les aliments d'origines animales et les produits pharmaceutiques. Avant analyse par PCR en temps réel, l'ADN doit être extrait de la substance de départ. L'ADN doit être extrait en ajoutant le tampon de lyse (foodlysis buffer) et la protéinaseK.

1 - Contrôle négatif

Chaque analyse PCR doit comprendre au moins un contrôle négatif. Cela permet d'évaluer la contamination dans la réaction.

2 - Contrôle positif

Lors de l'analyse PCR sur des échantillons inconnus, il est recommandé d'effectuer une réaction de contrôle positif dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ADN bactérien ciblé. Un contrôle positif sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 10 µl de l'ADN de contrôle positif fourni avec le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

(Anonyme. 2013)

I.2.2-2.b. L'amplification et l'identification de Salmonella spp par PCR en temps réel dans l'échantillon de viande:

-Manuel mericon PCR kit Salmonella spp (24)

- **Introduction**

Le kit **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** est une solution hautement spécifique et sensible servant à détecter l'ADN de Salmonella dans les aliments, les aliments d'origines animales et dans les produits pharmaceutiques.

Le protocole inclut la préparation d'une culture d'enrichissement suivie d'une purification manuelle ou automatisée de l'ADN d'espèces de Salmonella de même qu'une analyse de PCR en temps réel permettant de déterminer la présence ou l'absence de pathogènes à l'aide du test **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** d'espèces de Salmonella sur le Rotor-Gene® Q

- **Principe**

La réaction en chaîne par polymérase (PCR) repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est décelé au moyen de fluorophores. Ceux-ci sont généralement liés à des sondes oligonucléotidiques qui se lient spécifiquement au produit amplifié. La surveillance des intensités de fluorescence pendant l'analyse PCR (c.-à-d. en temps réel) permet la détection de l'accumulation de produit sans avoir à rouvrir les tubes de réaction par la suite.

Le **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ADN de **Salmonella**, y compris un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle interne. L'ADN de contrôle interne assure la réussite de la purification et de l'amplification des tests en intégrant la procédure de purification de l'ADN.

Le kit utilise deux combinaisons amorce/sonde spécifiques l'une pour l'ADN de **Salmonella spp** générant une fluorescence FAM™ et l'autre pour le contrôle interne générant une fluorescence MAX™.

Le contrôle positif contient de l'ADN de **Salmonella** et sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel.

- **Extraction d'ADN**

Le **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** peut être utilisé pour la détection de l'ADN de **Salmonella** dans les aliments, les aliments d'origines animales et les produits pharmaceutiques. Avant analyse par PCR en temps réel, l'ADN doit être extrait de la substance de départ. L'ADN doit être extrait en ajoutant le tampon de lyse (foodlysis buffer) et la protéinaseK

1 - Contrôle négatif

Chaque analyse PCR doit comprendre au moins un contrôle négatif. Cela permet d'évaluer la contamination dans la réaction.

2 - Contrôle positif

Lors de l'analyse PCR sur des échantillons inconnus, il est recommandé d'effectuer une réaction de contrôle positif dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ADN bactérien ciblé. Un contrôle positif sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 10 µl de l'ADN de contrôle positif fourni avec le **mericon PCR kit Salmonellaspp (24)** pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

(Anonyme. 2013)

À effectuer avant de commencer l'analyse

Le bloc de chargement de PCR doit être conservé au réfrigérateur afin d'assurer que la préparation de la PCR s'effectue dans des conditions de température stables.

I.2.2-3 Protocole : Préparation manuelle du test

Avant l'utilisation, il faut reconstituer les tubes lyophilisés.

On a 4 tubes :

Tube jaune (PCR essay).

Tube bleu (Multiplex PCR ou master mix) «il contient : DNTP, sondes Taq polymérase

Tube rouge (contrôle positif).

Tube noir (Quantitectnucleicacid) Dilution Buffer



- On prend 130 µl du contenu du tube bleu dans le tube jaune.
- Mélanger 5 fois avec la pipette et centrifuger quelques secondes à 4000 tours/mn.
- On prend 200 µl du contenu du tube noir dans le tube rouge .
- Mélanger 5 fois avec la pipette et centrifuger quelques secondes à 4000 tours/mn.
- Maintenant on a 02 tubes jaune et rouge près à l'emploi et 01 tube de l'échantillon préparé d'avance.
- On prépare trois eppendorf (tube de 20 µl) :
 - Un pour le contrôle positif
 - Un pour le contrôle négatif
 - Un pour l'échantillon
- Mettre 10 µl du tube jaune dans les trois eppendorf.
- Mettre 10 µl de l'échantillon (extractum d'ADN) dans l'eppendorf de l'échantillon.
- Mettre 10 µl du tube rouge dans l'eppendorf contrôle positif.
- Mettre 10 µl soit du quantitectnucleicacid ou RNASE free water dans l'eppendorf contrôle négatif.

Remarque : Le total de volume de chaque eppendorf est de 20 µl

- Faire passer les trois eppendorf dans l'appareil PCR.

Tableau N°05 : Préparation du mélange réactionnel

| Composants | Echantillon | Contrôle positif de PCR | Contrôle négatif de PCR |
|---|--------------|-------------------------|-------------------------|
| Test mericonreconstitué | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| ADN de l'échantillon | 10 µl | | |
| ADN de contrôle positif dissous | | 10 µl | |
| Tampon de dilution d'acide nucléique quantitect ou eau sans Rnase | / | / | 10ul |
| Volume total | 20ul | 20ul | 20ul |

I.2.2-4. Protocole expérimental de l'analyse par Rotor-gène Q series software système

Le programme de la détection de l'ADN de *Staphylococcus aureus* et de *Salmonella spp* dans les échantillons de produits alimentaires analysés,

Par le logiciel est représenté par les étapes suivantes :

- Ouverture du programme on cliquant sur l'icône **Rotor-gène Q series software système** apparaît sur le bureau.
- Ouverture d'une fenêtre **New Run**
- Cliquer sur **Advanced**.
- Cliquer sur la case **New** qui apparaît au bas de la fenêtre.
- Ouverture d'une fenêtre **New Run Wizard** pour choisir le type et la couleur des nacelles.
- Cocher sur **Locking Ring Attached**.
- Cliquer sur **Next**, une fenêtre apparaît afin d'introduire les différentes données concernant le nom de l'opérateur, le volume d'appendice de PCR utilisé et les numéros d'emplacement des échantillons.
- Cliquer sur **Next** au bas de la fenêtre.
- Cliquer sur **edit profil** et sélectionner le **Hold**.
- Déployer la case **Insert before** et cliquer sur **New Hold température** pour régler Hold température et Hold time.
- Sélectionner **Cycling** et cliquer sur **New cycling** pour programmer les températures et le temps.

Programme PCR (Tableau N°06) :

| Etapes | Temps | Température | Commentaires |
|------------------------------------|-------------------|---------------------|--|
| Etape d'activation de PCR initiale | 5min | 95°C | Activation de l'ADN polymérase HotStarTaq plus |
| Cycle en 3 étapes | | | |
| Dénaturation | 15s | 95°C | Collecte des données à 60°C |
| Hybridation | 15s | 60°C | |
| Extension | 10s | 70°C | |
| Nombre de cycle | 40 | | |
| Détection | Marqueur | Excitation/Emission | Canal |
| Cible | FAM TM | 495/520 nm | Cycle A vert |
| Contrôle interne | MAX TM | 524/557 nm | Cycle A jaune |

- Sélectionner **Acquiring to cycling**.
- Ouverture d'une fenêtre **Acquisition** pour choisir les couleurs seulement green et yellow.
- Cliquer sur **ok** et cliquer une deuxième fois sur **OK**.
- Cliquer sur **Next**.
- Cliquer sur **Start Run**.
- Ouverture d'une fenêtre **Save as** pour enregistrer le nom de l'analyse.
- Cliquer sur **Save**.

- Une fenêtre s'ouvre **New RunWizard** pour enregistrer les noms des échantillons à analyser.
- Les résultats d'analyses sont donnés sous forme de graphes

II -Résultats et discussion

II -1-Résultats

II.1. A/ Résultats d'analyse microbiologique :

II.1. A.1 La viande

Après broyage et homogénéisation de 10 échantillons de la viande de différents points on a obtenu les résultats microbiologiques qui sont représentés dans le tableau N°6 :

Tableau N° 6 : Résultats des analyses microbiologique de la viande

| Echantillon | Viande | Normes Requises ^(*) |
|-------------------|---------|--------------------------------|
| Germes recherchés | | |
| Salmonella | Absence | Absence |

^(*) : Arrêté Interministériel du 24.01.1998 relatif aux spécifications microbiologiques des viandes rouges.

On constate d'après les résultats (Tableau 1), une absence totale de germes pathogènes (salmonelle).

Au vu des normes microbiologique (absence) , on peut conclure que cette viande est de qualité satisfaisante.

II.1.A.1.1. Isolement et identification des espèces salmonella:

En culture sur le milieu Héктоэн, l'observation macroscopique des échantillons de produits alimentaires homogénéisés (la viande) analysés après incubation (24h), a fait ressortir l'absence totale de germe pathogène de genre *salmonella* (c'est a dire absence des **Colonies incolores à centre noir**)



Figure 10: Observation macroscopique sur milieu Hektoen (absence de salmonelle)

II.1. A.2 Les abats de poulet crus

Après broyage et homogénéisation de 10 échantillons des abats de poulet crus de différents points on a obtenu les résultats microbiologiques qui sont représentés dans le tableau N°7 :

Tableau N° 7: Résultats des analyses microbiologique des abats de poulet crus

| Echantillon / Germes recherchés | Abats de poulet crus | Normes Requises (**) |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|
| Staphylocoques aureus | 10^3 | 5.10^2 |
| Salmonella | Absence | Absence dans 1g |

(**): Arrêté Interministériel du 24.01.1998 relatif aux spécifications microbiologiques des volailles et leurs produits dérivés.

Les résultats de l'analyse bactériologique des abats de poulet crus ont révélés l'absence des salmonelles et la présence de staphylocoques aureus en quantité supérieurs aux normes requises, cela nous amène à dire que ces abats ne sont pas conformes aux règles d'hygiène et la réglementation en vigueur.

II.1.A.2.1. Identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* :

A partir des colonies de *Staphylococcus*, on réalise l'identification *Staphylococcus aureus* par des tests morphologiques et biochimiques, qui se résument aux examens suivants :

II.1.A. 2 .1.a Examen macroscopique :

En culture sur le milieu Chapman, l'observation macroscopique d'échantillons de produit alimentaire (les abats de poulet crus) montre la présence des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, lisses brillante et de couleur jaune

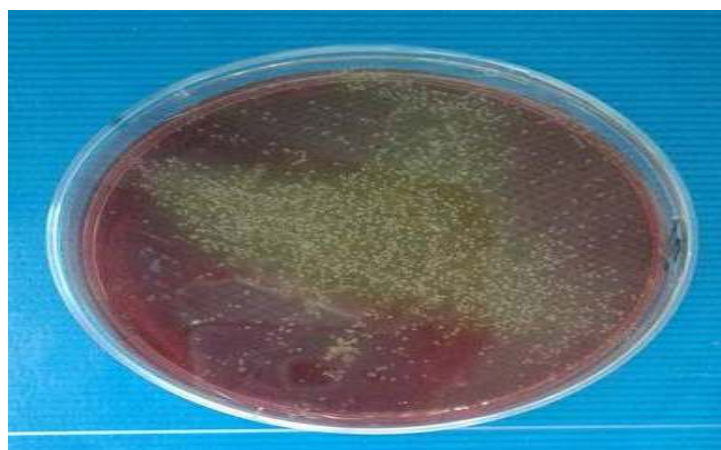


Figure 11 : Observation macroscopique de face de *Staphylococcus aureus*

II.1. A. 2.1.b. Examen biochimique :

Les résultats de test de coagulase confirment la présence de bactérie pathogène *Staphylococcus aureus* après la coagulation de plasma de lapin et la formation d'une masse dans le tube à hémolyse.



Figure 12: Test de coagulase positif de bactérie *Staphylococcus aureus*

II.1. A.3. Le camembert

Après broyage et homogénéisation de 10 échantillons de camembert de différents points on a obtenu les résultats microbiologiques qui sont représentés dans le tableau tableau N°8 :

Tableau N°8: Résultats des analyses microbiologique de camembert

| Echantillon Germes recherchés | camembert | Normes Requises ^(***) |
|----------------------------------|-----------|----------------------------------|
| E. coli | 10^2 | Non Déterminé |
| Staphylocoques aureus | 10^3 | 10^2 |

^(***) : Arrêté Interministériel du 24.01.1998 relatif aux spécifications microbiologiques des laits et des produits laitiers.

On a remarqué que l'échantillon de camembert est de mauvaise qualité microbiologique car il contient des staphylocoques et E coli en quantité intolérable indicateur de contamination fécale et du manque d'hygiène, cela s'explique par le non-respect des règles d'hygiène lors de sa fabrication et de mauvaises conditions de sa conservation.



Figure 13 : Observation macroscopique de colonies d'*Escherichia coli* sur milieu chromogénique (PTX)

II.1. A.4. Le lait cru :

Après broyage et homogénéisation de 12 échantillons de lait cru de différents points on a obtenu les résultats microbiologiques qui sont représentés dans le tableau N°9 :

Tableau N° 9 : Résultats des analyses microbiologique des échantillons de lait cru

| Echantillons / Germes recherchés | Point A | Point B | Point C | Normes Requises |
|----------------------------------|---------|-----------------|---------|-----------------|
| Staphylocoques aureus | Absence | 10 ² | Absence | Absence |
| E. coli | Absence | 10 | Absence | Non Déterminer |

(*) : Arrêté Interministériel du 24.01.1998 relatif aux spécifications microbiologiques des laits et des produits laitiers.

Les résultats montrent :

- - la présence d'E. coli dans l'échantillon de lait prélevé au niveau du point B, indice de contamination fécale.

On a constaté que l'échantillon de lait cru prélevé au niveau du point B ne répond pas aux normes requises, cela s'explique par le non-respect de règles d'hygiène, par contre les laits prélevés au niveau des points A et C sont de qualité satisfaisante.

II.1. B / Résultats d'analyse génétique:

| Amplification du contrôle interne | Amplification de l'échantillon | résultat |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| + | + | Echantillon est positif |
| + | - | Echantillon est négatif |
| - | - | Echec de la PCR |

Tableau 10: Résumé des résultats possibles

L'inhibition partielle de la PCR en raison de la présence de concentrations d'inhibiteurs décelables mais tolérables dans les échantillons est généralement indiquée par le fait que le contrôle interne tend vers des valeurs CT supérieures.

II.1.B.1- l'interprétation des résultats :

L'interprétation des résultats des échantillons peut être déterminée à condition que des réactions de contrôle positif et négatif soient effectuées. Le contrôle positif doit émettre un signal sur les canaux FAM et MAX. Le contrôle négatif ne doit émettre aucun signal sur les canaux FAM et MAX.

Lors de l'analyse PCR sur des échantillons inconnus, il est recommandé d'effectuer une réaction de contrôle positif dans l'analyse PCR, avec un échantillon connu pour inclure l'ADN bactérien ciblé. Un contrôle positif sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, **par exemple** la préparation correcte du mélange réactionnel. Utiliser 10 µl de l'ADN de contrôle positif fourni avec le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** ou Le **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** pour vérifier que l'amplification de la cible est réussie.

II.1.B.1.1. Résultats de l'analyse génétique des abats de poulet crus :

L'analyse par la PCR en temps réel a détecté des régions spécifiques du génome de l'agent pathogène (**Staphylococcus aureus**), après vérification par sonde d'hybridation (contrôle interne) correspondant à une valeur de CT* comprise entre 21 et 28, ce qui signifie la présence de **Staphylococcus aureus** dans l'échantillon des abats de poulets crus.

* : Cycle seuil (CT) : cycle auquel le graphique d'amplification atteint le seuil, c.-à-d. qu'il y a une augmentation nettement décelable de la fluorescence.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le graphe suivant

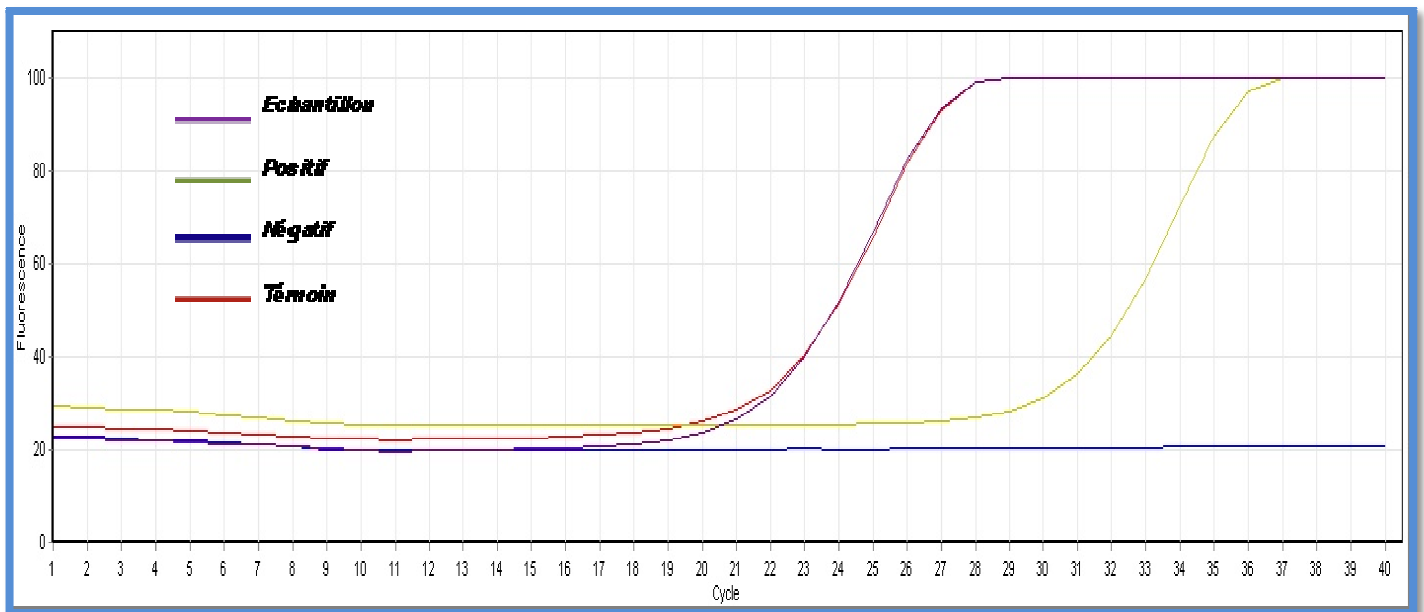


figure14: Graphe d'amplification de PCR en temps réel (Staphylococcus aureus)

II.1.B.1.2. Résultats de l'analyse génétique de viande :

L'analyse par la PCR en temps réel n'a pas détecté des régions spécifiques du génome de l'agent pathogène (**Salmonelle**), après vérification par sonde d'hybridation (contrôle interne), ce qui signifie l'absence de **salmonelle** dans l'échantillon de la viande.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le graphe suivant :

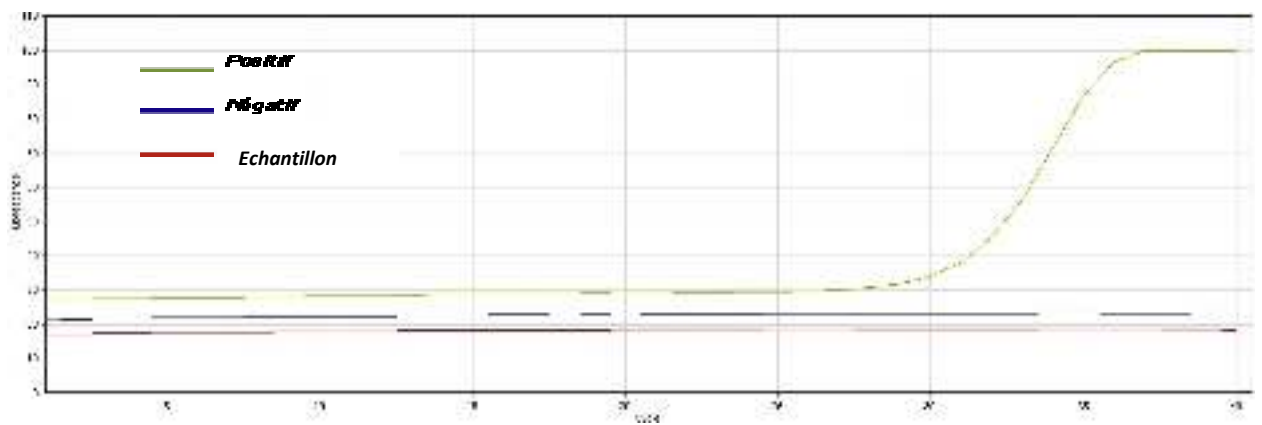


Figure 15 : Graph d'amplification de PCR en temps réel (Salmonelle).

II.2 Discussion :

L'intérêt de développer de nouveaux outils de diagnostic et de détection bactériologiques rapides est par conséquent de plus en plus important pour les scientifiques, les industriels et les organismes de réglementation.

Notre étude avait pour objectifs d'étudier trois germes pathogènes *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* en tant que contaminants alimentaires, aboutissant chez l'homme à des troubles digestifs. Cette étude se base sur la recherche de ces 03 germes dans les aliments sur le territoire Algérien. Après leur isolement sur des milieux sélectifs, ces souches seront par la suite identifiées sur deux plans : caractérisation biochimique par les tests classiques d'identification et caractérisation moléculaire en utilisant la technique PCR en temps réel.

Les méthodes conventionnelles utilisées pour la détection et l'identification des agents pathogènes, reposent principalement sur l'identification microbiologique et biochimique.

Traditionnellement, la première étape de l'identification bactérienne, consiste à en obtenir une culture pure contenant un seul isolat bactérien. A partir de cette culture, on va confronter un certain nombre de caractères morphologiques, culturels et biochimiques de cet organisme inconnu, avec ceux des nombreuses espèces connues jusqu'à trouver une similitude. L'origine de l'organisme fournit souvent des indications qui, ajoutées à quelques observations et tests simples, peuvent conduire à l'identité possible de l'organisme ou tout au moins, de circonscrire la recherche à l'un des principaux groupes bactériens.

Les souches de *staphylococcus aureus*, isolées sur les milieux sélectifs Chapman, sont identifiées avec succès par le test classique, et aussi pour l'isolement du genre *Escherichia* sur le milieu PTX

Pour la *Salmonella* l'absence totale de cette flore dans tous les échantillons alimentaires analysés (viande et abats de poulet crus) est notée (Tableau 6.7). La norme concernant la salmonella est l'absence du germe dans ces produits alimentaires, ce résultat montre la bonne conduite d'hygiène

cette étape d'identification est importante avant de passer à l'identification moléculaire par PCR en temps réel. A-propos de la PCR en temps réel a permis une identification correcte et hautement spécifique pour la plupart des souches dans un intervalle de temps très réduit par rapport aux méthodes classiques

Concernant l'amplification par PCR en temps réel, les résultats ont également confirmé les résultats obtenus par la méthode classique :

1-staphylococcus Aureus :

Dans ce travail on a amplifié le gène pathogène de *staphylococcus Aureus* par l'utilisation de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui repose sur l'amplification de régions spécifiques du génome de l'agent pathogène. Dans la PCR en temps réel, le produit amplifié est détecté au moyen de fluorophores. Ceux-ci sont généralement liés à des sondes oligonucléotidiques qui se lient spécifiquement au produit amplifié. La surveillance des intensités de fluorescence pendant l'analyse PCR (c.-à-d. en temps réel) permet la détection de l'accumulation de produit sans avoir à rouvrir les tubes de réaction par la suite.

Le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** c'est une solution hautement spécifique et sensible servant à détecter l'ADN de *staphylococcus aureus* dans les aliments, ce kit contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ADN de **staphylococcus aureus**, y compris

- Un contrôle positif contient de l'ADN de **staphylococcus aureus** et sert à prouver la fonctionnalité du dosage de l'agent pathogène, par exemple la préparation correcte du mélange réactionnel.

- Un contrôle négatif qui permet d'évaluer la contamination dans la réaction.

- Un contrôle interne (la sonde d'hybridation) un fragment d'ADN spécifique des *Staphylococcus aureus* correspondant à une valeur de CT^* comprise entre 21 et 28. assure la réussite de la purification et de l'amplification des tests en intégrant la procédure de purification de l'ADN.

Le kit utilise deux combinaisons amorce/sonde spécifiques l'une pour l'ADN de **staphylococcus aureus** générant une fluorescence FAM™ et l'autre pour le contrôle interne générant une fluorescence MAX™ et l'interprétation des résultats des échantillons peut être déterminée à condition que des réactions de contrôle positif et négatif soient effectuées.

Les résultats obtenus confirment la présence du génome de l'agent pathogène de *Staphylococcus aureus* (**résultat positif et le test est valide**) car : L'échantillon émet un signal sur les canaux FAM et MAX, Le contrôle positif émet un signal sur les canaux FAM et MAX et le contrôle négatif n'émet pas de signal sur le canal FAM

ce qui est traduit par la montée de courbe de notre échantillon vis-à-vis à la courbe de contrôle positif.

2. Salmonelle

Comme Le **mericon PCR kit S.Aureus (24)** , Le kit **mericon PCR kit Salmonella spp (24)** est une solution hautement spécifique et sensible servant à détecter l'ADN de **Salmonella** dans les aliments, les aliments d'origines animales et dans les produits pharmaceutiques. contient tous les réactifs nécessaires pour la détection de l'ADN de **Salmonella**, y compris y compris un contrôle positif, un contrôle négatif et un contrôle interne. L'ADN de contrôle interne

L'analyse par la PCR en temps réel n'a pas détecté des régions spécifiques du génome de l'agent pathogène (**Salmonelle**), après vérification par la sonde d'hybridation (contrôle interne), ce qui explique pourquoi La courbe de notre échantillon reste toujours linéaire et aussi toujours en parallèle avec La courbe de contrôle négatif au cours de processus,

Les resultats obtenu sont donc négatifs car :L'échantillon émet un signal sur le canal MAX mais pas sur le canal FAM , Le contrôle positif émet un signal sur les canaux FAM et MAX (la montée de courbe de control positif au cour de processus avec une valeur CT* 28) et Le contrôle négatif n'émet pas de signal sur le canal FAM Notons que Un signal MAX positif signifie que l'extraction et l'amplification ont réussi. Ces résultats obtenu confirme l'absence du génome de l'agent pathogène de Staphylococcus aureus (**résultat négatif et le test est valide**).

III : Conclusion

Au terme de ce travail nous avons utilisé la PCR en temp réel comme moyen d'identification des bactéries pathogènes , contribuant ainsi aux diagnostic rapide des infections causées par des micro-organismes fastidieux pour lesquels la culture est difficile, voire impossible. L'objet de notre étude est de rappeler quelles sont les techniques moléculaires disponibles pour détecter un agent pathogène et de proposer un algorithme d'interprétation d'un résultat de PCR englobant les niveaux analytiques et cliniques.

Les méthodes conventionnelles basées sur la culture et les tests métaboliques «biochimiques » sont utilisées comme méthode de référence pour la détection de plusieurs agents de toxi-infections alimentaires, tels que S. aureus, Salmonella, Coliformes, E. coli... etc. Cette méthode standard qu'on a utilisé pour la détection peut nécessiter jusqu'à 6 jours pour nous donnée des résultats satisfaisants, car elle repose sur la capacité des micro-organismes à se multiplier et à donner des colonies visibles à l'œil nu (colonies bleu pour E. coli et colonie jaune pour S. aureus...etc)

Bien que ces méthodes soient sensibles, peu coûteuses pour certaines et donnent à la fois des informations qualitatives et quantitatives des micro-organismes testés, elles sont grandement limitées par le temps nécessaire pour l'identification de la bactérie, mais aussi par le temps nécessaire à l'enrichissement initial.

La réaction de polymérisation en chaîne en temp réel (RT-PCR) est une technique alternative, attractive en raison de sa rapidité, sensibilité (l'utilisation d'une sonde TaqMan en plus des deux amorces augmente fortement la spécificité des amplicons générés) ,reproductibilité et de leur délai de réponse. (elle nécessite 3 heures). Cependant, il est utile de connaître les limites des analyses PCR afin d'interpréter correctement les résultats obtenus. L'interprétation est fonction de la fiabilité des tests utilisés, des pathogènes recherchés, du site d'infection, et de la présentation clinique. Il est essentiel que les cliniciens généticiens et les microbiologistes partagent leurs expériences, afin que les niveaux analytiques et cliniques d'interprétation puissent être combinés

Références bibliographiques

1. **Anonyme .2003.** Bactériologie. DCEM1. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie .Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière Service de Bactériologie .p69.
2. **Anonyme. 2014.** Structure et physiologie de la bactérie : Anatomie - Structure . Collégiale des enseignants de bactériologie-virologie-hygiène. p 03.
3. **Avril J-L, Dabernat H, Denis F, Montiel H, (1992).** Bactériologie clinique, 2ème édition Paris. P 168-171.
4. **Bernard PS, Wittwer CT.2002.** Real-time PCR technology for cancer diagnostics. Clin Chem 2002 ; 48 : 1178-85.
5. **Bustin, S. A. 2000.** Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology # 25: 169-19.
6. **Callon, C., Gilbert, FB., De Cremoux, R., Montel, MC. 2007.** Application of variable number of tandem repeat analysis to determine the origin of S.aureus contamination from milk to cheese in goat cheese farms. Food Control.; 19, p143-150.
7. **.CaplinBE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT.1999.** LightCyclerTM hybridization probes. The most direct way to monitor PCR amplification for quantitation and mutation detection. *Roche Mol Biochem Biochim.*1 : 5-8.
8. **.Claire konig . 2007.**Bactéries pathogènes pour l'homme .dossier - Bactéries et microbes en tout genre..p06
9. **Clegg RM. 1995.** Fluorescence resonance energy transfer. *CurrOpinBiotechnol* ; 6 : 103-10.
10. **Danyluk, M.D., Nozawa-Inoue, M., Hristova, K.R., Scow, K.M., Lampinen, B., Harris, L.J., 2008,** Survival and growth of Salmonella Enteritidis PT 30 in almond orchard soils. Journal of Applied Microbiology 104, 1391-1399.

11. **D'Aoust J.-Y. (1989)** .*Salmonella*. In : M.P.Doyle (ed.), Food borne Bacterial pathogens. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. p.327-445.
12. **Drouet Emmanuel .(2011/2012)**. Microbes et Microbiologie Université Joseph Fourier de Grenoble Partie 1 :p210 .
13. **Dworkin,M., Falkow,S., Rosenberg,E., Schkeufer, KH., Stackebrandt,E. , 2006**. The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York Vol 4, Chap.1.2.1. The genera Staphylococcus and Micrococcus, p4-75.
14. **Edmiston Jr.CE., Seabrook, GR., Cambria, RA., Brown, KR., Lewis, BD., Sommers, JR., Krepel, CJ., Wilson, PJ., Sinski, S., Towne, JB. . 2005**. Molecular epidemiology of microbial contamination in the operating room environment: Is there a risk for infection? Surgery; 138 (4), p573-582.
15. **Fauchère ,J.L ,Avril.J.L.2003**.Bactériologie générale et médicale,Ellipses édition ,Marketing S.A .FRANCE .p239
16. **FosterVTH .1948**. Zwischenmolekulareenergiewanderung und fluoreszenz. Annals of Physics (Leipzig), 2 : 55-75.
17. **François Pebret, 2003**.Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des etudes médicales ou paramédicale .P65.
18. **Garland ,Amir, LH., , SM., Lumley, J. 2006**. A case-control study of mastitis: nasal carriage of Staphylococcus aureus. BMC Fam Pract. 11, p57
19. **Gautier Marie-Françoise Fondamental .Rémi ALARY, , Philippe Joudrier, INRA .Décembre 2002**.La PCR quantitative en temps réel : application à la quantification des OGM Volume 9, Numéro 6, p73
20. **Germany, Yves. 1994**. Apport de l'épidémiologie et des connaissances physiopathologiques sur les *Esherichia coli* agents d'entérites, pour leur diagnostic

microbiologique et moléculaire lors de la coproculture. *Annales de l'institut Pasteur*.1994. 3: 175-195.

21. **Gibson, U. E., Heid, C. A. and Williams, P. M. 1996.** A novel method for real time quantitative RT-PCR. *GenomeResearch* # 6: 995-1001.
22. **Ginzinger DG.2002.** Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *ExpHematol*2002 ; 30 : 503-12.
23. **Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2007.** An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*2001 ; 25 : 386-401
24. **Glazer AN, Mathies RA. 1997 .** Energy-transfer fluorescent reagents for DNA analyses. *Curr Opin Biotechnol* .8 : 94-10
25. **Grimont P.A.D., Grimont F. et Bouvet P.J.M.,(2000).** *Salmonella* .In : Freney J., Renaud F., Hansen W. et Bollet C. Précis de Bactériologie clinique. Paris : Editions ESKA. P.1 137-1156
26. **Grimont, P.A.D., Weill, F.X., 2007,** Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*.P45
27. **Hanes, D., 2003,** Nontyphoid *Salmonella*, Bier J. (Eds) International Handbook of Foodborne Pathogens Edition. MilotisN., New york, 137-149 pp.
28. **Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. 1992.** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* # 10: 413-417.
29. **Higuchi R, FocklerC ,Dollinger G , Waltson , R. 1993.** Kinetic PCR analysis. Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technol*, 11 : 1026-30

30. **Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH .1991.** Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermusaquaticus* DNA polymerase. *Proc NatlAcadSci USA*, 88 : 7276-80.
31. **Hu, L., Kopecko, D., 2003,** typhoid *salmonella.*, Bier J., *International Handbook of Foodborne pathogens.* Edition. Milotis N, New York, 151-165 pp.
32. **Humbert, F., Sautra, L., Federighi, M., Jouve, J.-L., 1998,** Les salmonelles, In: *Manuel de bactériologie alimentaire.*
33. **Humphrey, T., 2001,** *Salmonella typhimurium* definitive type 104 a multi-resistant *Salmonella.* *International Journal of Food Microbiology* 67, 173-186.
34. **ICMSF., 1996,** *Micro-organisms in Foods. Microbiological specifications of food pathogens.* Blackie academic.
35. **Kaplan J-C , Delpech M . 1989 .***Biologie moléculaire et médecine .Médecine – Sciences* Edition Flammarion. p 610) .
36. **Kloos, WE., Zimmerman, RJ., Smith, RF. 1976 ,**Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Appl Environ Microbiol.* 31, p53-49.
37. **Komacki I. Marth E.H . 1982 .**Fate of non pathogenic and enteropathogenic *Escherichia coli* during the manufacture of colby –like cheese .*J.Food Protect* 45 (4) , 310-316 .
38. **Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR, Schmidt CA. 2000 .** Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan™ probe format in the LightCycler™ instrument. *Mol Cell Probes* .14 : 57-60.
39. **. KutyavinIV,AfoninaIA,Mills A, et al. 2000.**3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *NuclAcids Res.*28 : 655-61.

- 40. Langridge G. C., Wain J., and Nair S. (2005).** Invasive Salmonellosis in Humans. *EcoSalPlus* .Cambrige CB 10.
- 41. Levine, 1987.**Escherichia coli :Mechanisms of virulence.departement of microbiology and medical school ,Newcastel upon tyne .p 156
- 42. LivakKJ, Flood SJA, Marmaro J, GiustiW, Deetz K. 1995** .Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR MethodsAppl* .4 : 357-62.
- 43. Louise H. Taylor, Maissane. Latham et Mark E. J. Woolhouse, 29 juillet 2001.**« *Risk factors for human disease emergence* », *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 356, , p. 983–989)
- 44. Manuel du mericon PCR kit S.Aureus** pour la détection d'ADN de *staphylococcus aureus* . Décembre 2013.QIAGEN.
- 45. Manuel du mericon PCR kit Salmonella** pour la détection d'ADN de *Salmonelle* . Décembre 2013.QIAGEN.
- 46. Morrison C, Gannon F.1994.** The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *BiochimBiophys Acta*. 1219 : 493-8.
- 47. Nataro JP, Kaper JB. 1998.** Apr Diarrheagenic E. coli. *ClinMicrobiol Rev*. 1998 Jan ; 11(1):142-201. Revue. Erratum in: *Clin Microbiol Rev*;11(2):403
- 48. Nazarenko IA, Bhatnagar SK, Hohman RJ. 1997.**A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer. *Nucl AcidsRes* ; 25 : 2516-2
- 49. Nguyen, MH., Kauffman, CA., Goodman, RP. 1999.** Nasal carriage and infection with *Staphylococcus aureus* in HIV-infected patient. *Ann Intern Med.*; 130, p221-225

- 50. Niesters HG.2001** . Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*; 25 : p 419-29.
- 51. Padye N.V. & Doyle M.P. 1991.**Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in food. *Appl. environ. Microbiol*, **57**, 2693-2698.
- 52. Pitt J.L et Hocking. (1997).** Fungi and food spoilage. edition. Londonblackie Academic and Professional .p 45
- 53. Pohl ,P.Oswald,E.VanMylem ,K. Jacquemin.E.Lintermans et Mainil.1993.** les *Escherichia coli* producing CNF1et CNF2 cytotoxins in animals with différent disorders .*Veterinary research* .24 p 04
- 54. Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. 2001** .Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Mol Diagn*2001 ; 3 : 26
- 55. Robinson R. K., Batt C. A., Patel P. D.(2000).** Encyclopedia of Food Microbiology.
- 56. Smith, AJ., Jackson, MS., Bagg, J. 2001.**The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. *J Med Microbiol.*; 50, p940-946.
- 57. SvanvikN, StåhlbergA, SehlstedtU, SjöbackR,Kubista M. 2000** .Detection of PCR products in real time using light-up probes. *Anal Biochem* .287 : 179-82.
- 58. Tse.C ,Capeau.j. mai-juin 2003.** Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin*, vol. 61, n° 3, P280
- 59. Waston, K., Carville, K., Bowman, J., Jacoby, P., Riley, TV., Leach, AJ., Lehmann, D. 2006.**UpperRespiratory Tract Bacterial Carriage in Aboriginal and Non-Aboriginal Children in a Semi-Arid Area of Western Australia. *Pediatrinfec Dis J*. 25, p782-790.

- 60. Williams, RE.1963.** Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. *Bacteriol Rev.* 27, p56-71.
- 61. Williams, RE. Smith, AJ., Jackson, MS., Bagg, J. 2001.**The ecology of staphylococcus species in the oral cavity. *J Med Microbiol.* 50, p940-946.
- 62. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP .1997.** Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* .22 : 130-8.
- 63. Yu, VL., Goetz, A., Wagener, M. 1989.** *Staphylococcus aureus* nasal carriage and infection in patients on hemodialysis efficacy of antibiotic prophylaxis *N Eng J Med* ;315.p91- 96

Site :

-http://7staphylococcus-aureus.blogspot.fr/2007/11/diagnostico-laboratorio_14.html, consulté en novembre 2012 .

-<http://desbiol.univ-paris5.fr/B15-obs07/index.html>, consulté en novembre 2012.

webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://biochem.free.fr/Microbiologie.html

-[www.gene-quantification.info/The Reference in qPCR &dPCR](http://www.gene-quantification.info/The%20Reference%20in%20qPCR%20&dPCR) - Academic& Industrial Information Platform

ANNEXE

II.1.3. Liste des produits utilisés

- Bouillon TSE (Tryptone Sel Eau)
- Eau physiologique
- additif (Institut Pasteur d'Algérie, I.P.A.)
- Bouillon d'enrichissement Giollitécontoni
- plasma de lapin
- Le phénol
- L'éthanol
- Tompon de lyse (food lyse buffer) 200ml
- protéinase K
- Le chloroforme
- La sonde TaqmanTM
- buffer AW 2 (wash buffer) concentration 13ml
- buffer PB (binding buffer) 30ml
- buffer EB (élution buffer) 15ml

II.1.5 Verreries et accessoires:

- Tubes à essais stériles
- boites pétrie
- micropipettes
- Pipettes pasteur stériles
- Becher
- Eppendorf
- blender
- pince
- Tubes à microcentrifugeuse (1,5 ml ou 2 ml)

II.1.5. Milieux de cultures

- 1) **Milieu de culture Chapman:** pour l'identification des staphylococcus aureus
Composition typique (gramme/litre)

| . Composition dans 1L d'eau distillé | (g/l) |
|--------------------------------------|-------|
| Peptone..... | 11 |
| Extrait de viande..... | 1 |
| NaCl..... | 75 |
| Mannitol..... | 10 |
| Rouge de phénol..... | 0,025 |
| Agar..... | 15 |
| PH :..... | 7.5 |

2)Milieu de culture chromogénique PTX

La composition de ce milieu est la suivante :

Extrait de pomme de terre..... 1L
à partir de 200 g
Glucose20 g
Agar.....20g
pH 5,6

3)Le Bouillon Cœur Cervele (BHIB):

La composition de ce milieu est la suivante :

protéose-peptone10,0 g
infusion de cervelle de veau12,5 g
infusion de cœur de bœuf5,0 g
glucose2,0 g
chlorure de sodium5,0 g
hydrogénophosphate de sodium2,5 g
pH = 7,4

4) Milieu de culture hektoen :

| | |
|---|---------|
| protéose-peptone:..... | 12,0 g |
| extrait de levure :facteur de croissance | 3.0g |
| lactose :critere de différenciation | 12.0g |
| saccharose : critere de différenciation..... | 12,0 g |
| salicine : critere de différenciation..... | 2,0 g |
| citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H ₂ S..... | 1,5 g |
| sels biliaries : inhibiteur..... | 9,0 g |
| fuchsine acide : inhibiteur..... | 0,1 g |
| bleu de bromothymol : indicateur de pH..... | 0,065 g |
| chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique..... | 5,0 g |
| thiosulfate de sodium : précurseur d'H ₂ S..... | 5,0 g |
| agar..... | 14,0 g |

pH = 7,6

II.1.4. Appareils utilisés :



Bain marie (Marmmert)



Balance



Etuve (jouan)



Hôte bactériologique à flux lumineire
(TELSTAR AV 100)



PCR en temps réel (QIAGEN)



Mixeur (waring)



Centrifugeuse (DSAE-002)



Vortex (Labinco)



Pack de kit PCR en temps réel
(QIAGEN)