



Institut des Sciences  
Vétérinaire-Blida

Université Saad  
Dahleb-Blida 1-



Projet de Fin d'Etudes en vue de l'obtention du  
**Diplôme de Docteur Vétérinaire**

**Incidence des *Staphylococcus aureus* dans les Denrées  
Alimentaires. Confirmation des Facteurs de Virulence  
par PCR**

Présenté par  
**Meriem TEGUAR**

**Devant le jury :**

<b>Président(e)</b>	ADEL.D	MAA	ISV blida 1
<b>Examineur</b>	MOKRANI.D	MAA	ISV blida 1
<b>Promoteur</b>	BENSAFIA.S	Docteur vétérinaire	IPA
<b>Co-promoteur</b>	YAHIMI.A	MCB	ISV blida 1

**Année : 2016-2017**

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je tiens tout d'abord à remercier Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé au Service de Bactériologie des Aliments, des eaux, et de l'environnement de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA), sous la Direction Scientifique de Monsieur Sid Ahmed Bensefia, Docteur Vétérinaire au sein de l'Institut Pasteur d'Algérie et de Monsieur Abdelkrim Yahimi, Maître de conférences classe B à l'Institut des Sciences Vétérinaires de l'Université Saad Dahleb de Blida. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma très sincère reconnaissance pour leurs précieuses directives, leur très grande disponibilité, leurs fructueux conseils, leur suivi constant, leur courtoisie si raffinée et leurs qualités humaines.

Je suis très reconnaissante envers Madame Fawzia Mouffok de m'avoir autorisé à réaliser un tel travail expérimental au sein de son service. Je tiens également à remercier Monsieur Amine Mekhloufi pour avoir contribué à l'élaboration de ce travail. J'adresse en outre mes chaleureux remerciements à toute l'équipe, en particulier Mademoiselle Hadjer Oudina pour leur aide si précieuse lors des manipulations que j'ai effectuées au sein du service Bactériologie des Aliments, IPA.

Mes vives gratitude vont aussi à tous les enseignants ayant contribué à ma formation et ce depuis la première année primaire jusqu'à la dernière année de graduation, sans oublier mes camarades de la promotion 2017 pour la bonne ambiance qu'elles ont su créer et les idées fructueuses que nous avons échangées.

Je remercie d'une façon très particulière mes deux frères et sœur ainsi que toute ma famille pour leurs encouragements soutenus et surtout pour leur soutien moral.

Enfin, je ne saurais clore ce volet sans remercier mes parents, qui sans eux, mes études et ce travail n'aurait jamais abouti. Je ne les remercierai jamais assez pour leur patience, courage, conseils, exemples et dévouement jusqu'à l'achèvement de ce travail.

**Résumé :** Ce travail a pour but d'étudier l'incidence des *Staphylocoques aureus* à coagulas positive dans les denrées alimentaires et ce par deux méthodes connues dans le domaine de la microbiologie alimentaire. Pour cela, une étude microbiologique basée sur les méthodes de prélèvement, d'enrichissement et d'identification au test biochimique (catalase, coagulas) a été effectuée. Cette étude est suivie par une confirmation par l'examen moléculaire utilisant la méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'identification du génome de la coagulas. 50 prélèvements d'aliments de restauration dont 16 denrées alimentaires à base de viande, 18 denrées alimentaires à base de légumes et 16 produits divers ont été analysés. 14 souches de staphylocoques à coagulas positive ont été isolées soit une prévalence de 28%, dont les pourcentages selon la nature des trois produits précédemment cités sont 28,57%, 53,84% et 66,66% respectivement.

**Mots clés :** Denrées alimentaires, Toxi-Infection Alimentaire Collectives, Staphylocoques aureus, coagulas positive, facteurs de virulence, Réaction en Chaîne par Polymérase.

**Abstract :** This work aims to study the incidence of positive coagulas *Staphylocoques aureus* in foodstuffs using two methods in the food microbiology field, a microbiological study based on the methods of sampling, enrichment and identification to the biochemical test (catalase, coagulas), followed by confirmation by molecular examination using the Polymerase Chain Reaction (PCR) to identify the coagulas genome. 50 food samples have been analyzed, including 16 meat-based food ingredients, 18 vegetable-based food products, and 16 miscellaneous products. 14 strains of *Staphylocoques* with positive coagulas have been isolated, i.e a prevalence of 28%. The percentages according to the nature of the three previous products are 28.57%, 53.84% and 66.66% respectively.

**Keywords:** Foodstuffs, Collective food poisoning, *Staphylocoques aureus*, Positive Coagulas, Virulence Factors, Polymerase Chain Reaction.

**الخلاصة:** الهدف من هذا العمل هو دراسة حالات الإصابة بالمكورات العنقودية الذهبية الموجبة في الغذاء من خلال طريقتين معروفتين في مجال علم الأحياء المجهرية الغذائية: دراسة ميكروبيولوجية تستند إلى طرق أخذ العينات، وإثراء وتحديد الهوية مع اختبار الكيمياء الحيوية (الكاتالاز، كواغولاس). وتتبع الدراسة بتأكيد من قبل الفحص الجزيئي باستخدام طريقة تفاعل سلسلة البلمرة (بي سي ار) لتحديد الجينوم المخثر. تم تحليل 50 عينة غذائية منها 16 من الأطعمة المكونة أساسا من اللحوم، 18 من الأطعمة النباتية، و 16 من المنتجات المتنوعة. 14 سلالة من المكورات العنقودية إيجابية المخثرات تم عزلها بنسبة انتشار قدرها 28٪، النسب المئوية على أساس طبيعة المنتجات الثلاثة المذكورة أعلاه كانت كالتالي: 28.57٪، 53.84٪ و 66.66٪ على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** المواد الغذائية التسممات الغذائية الجماعية، المكورات العنقودية الذهبية، كواغولاس إيجابية، عوامل الفوعة، بي سي ار

## TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
<b>CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
I.1 TOXI-INFECTION ALIMENTAIRE COLLECTIVE (TIAC)	2
I.1.1 Définition	2
I.1.2 Catégories des TIAC	2
I.1.3 Principales intoxications alimentaires	2
I.1.4 Différentes sources de contamination	3
I.1.5 Méthodes de prévention	4
I.2 GENERALITES SUR LES STAPHYLOCOQUES	4
I.2.1 Historique	4
I.2.2 Définition	5
I.2.3 Classification et nomenclatures	5
I.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	9
I.3.1 Généralités	9
I.3.2 Habitat	9
I.3.3 Caractère morphologique	9
I.3.4 Caractères cultureux	9
I.3.5 Sensibilité	10
I.3.6 Résistance	10
I.3.7 Caractères structuraux	11
I.3.8 Caractère biochimique	11
I.3.9 Physio pathogénie	12
I.3.10 Régulation génique des facteurs de virulence	14
I.3.11 Pouvoir pathogène	15
I.3.12 Sensibilité et résistance aux ATB	15
I.3.13 Diagnostic	16
I.3.14 Traitement et prévention	16
I.4 STAPHYLOCOQUE ET DANGERS ALIMENTAIRE	17
I.5 REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	20
I.5.1 Historique et définition	20
I.5.2 Principe de la PCR	20
I.5.3 Eléments de la PCR	20
I.5.4 Réaction de la PCR	21
I.5.5 Applications de la PCR	23
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES</b>	
II.1 PRESENTATION DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE	25
II.2 MATERIEL ET METHODES	25

II.2.1 Matériel	25
II.2.2 Méthodes	28
II.2.2.1. Analyse microbiologique	28
II.2.2.2 Biologie moléculaire	32
<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSIONS</b>	
III.1 RESULTATS EXPERIMENTAUX	36
III.1.1 Identification bactériologique	36
III.1.2 Identification moléculaire	40
III.2 DISCUSSIONS	41
CONCLUSION GENERALE	43
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	44

INTRODUCTION  
GENERALE



Le monde bactérien a déjà existé pendant près de deux milliards d'années. En effet, les premiers êtres vivants étaient les bactéries. L'évolution de la diversité de micro-organisme largement dépasse celle des autres organismes. Cette diversité fait partie de leurs nombreuses propriétés. Ce monde bactérien comporte tous les procaryotes pathogènes connus à ce jour ainsi que certaines espèces non pathogènes [1, 2].

Parmi les espèces pathogènes les plus connus dans le monde bactérien, on distingue le *Staphylococcus aureus*. Cette bactérie appartient à la famille de *Staphylococcaceae*, produisant une catalase. Elle est très répandue dans la nature. Elle se caractérise par son pouvoir de sécréter plusieurs entérotoxines [1-3].

Les *Staphylococcus aureus* sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers. Elles sont considérées comme étant un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales (infections contractées en milieu hospitalier) comme elles peuvent aussi être contractées en dehors de l'hôpital (infections dites communautaires) [4, 5].

Certaines souches de staphylocoques à coagulas positive peuvent produire des entérotoxines, lorsque les conditions du milieu sont favorables. Les entérotoxines préformées et libérées dans l'aliment sont des protéines thermostables pouvant résister à des traitements thermiques de type stérilisation. Elles sont à l'origine du risque alimentaire puisqu'elles entraînent des intoxications à la suite de leur ingestion (TIA = Toxi-Infection d'origine Alimentaire) [4-7].

Le *S. aureus* est un agent pathogène de la nourriture et de l'alimentation d'importance clinique considérable. L'empoisonnement alimentaire staphylococcique reste un des types les plus courants d'intoxication alimentaire. Les aliments incriminés dans les TIA à *S. aureus* sont souvent des produits cuits contaminés après cuisson (viandes, poissons, tranches de charcuterie, pâtisseries à la crème glacée) ou des produits à teneur en eau réduite ou des fromages [3].

Nous nous intéressons à travers cette investigation d'étudier l'incidence des *Staphylocoques aureus* à coagulas positive dans les denrées alimentaires et ce par deux méthodes connues dans le domaine de la microbiologie alimentaire. Il s'agit d'abord de faire une étude microbiologique basée sur les méthodes de prélèvement, d'enrichissement et d'identification au test biochimique (catalase, coagulas). Cette étude est suivie par une confirmation par l'examen moléculaire par le biais de la méthode dite réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'identification du génome de la coagulas.

Ainsi, ce mémoire s'articule sur trois chapitres distincts. Dans le premier chapitre, des généralités sur les TIAC (Toxi-Infection Alimentaire collective), les *S.aureus*, et la PCR sont exposées. Le deuxième chapitre est consacré aux techniques expérimentales adoptées et aux matériels utilisés. Les résultats expérimentaux ainsi que les interprétations et les discussions sont exposés dans le dernier chapitre. Nous terminons notre mémoire par une conclusion générale représentant une synthèse globale de notre étude.

# Chapitre I

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1 TOXI-INFECTIION ALIMENTAIRE COLLECTIVE (TIAC)

### I.1.1 Définition

La Toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est une maladie infectieuse accidentelle, définie par l'apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'une symptomatologie digestifs, en général gastro-intestinale, qui peut être mortelle chez des sujets fragiles. La TIAC est contractée à la suite de l'ingestion de nourriture ou de boisson contaminées par des agents pathogènes (bactéries, virus, parasites, champignons microscopiques...) dont la cause peut être rapportée à une même origine qui est intoxication alimentaire provoquée par la consommation de produits contenant des toxines libérées par la croissance des bactéries [1].

Les types de restaurations collectives concernées sont :

- enseignement (lycée, collège, restaurant collectif universitaire...);
- santé et social (maison de retraite, portage de repas à domicile, entreprise...);
- du personnel territorial (cantine...);
- cuisine centrale et tous les agents qui manipulent des denrées alimentaires [2].

### I.1.2 Catégories des TIAC

Il existe plusieurs catégories de TIAC à savoir :

➤ **les Maladies Infectieuses Alimentaires (Les MIA)** : l'utilisateur consomme un aliment contaminé par un micro-organisme tel que les Salmonelles, Listeria, virus (hépatite A), etc. Ces micro-organismes se multiplient dans l'organisme après consommation de la préparation alimentaire. Le délai d'apparition des symptômes est long (entre 1 à 3 jours pour les bactéries) et la présence de seulement quelques micro-organismes dans un aliment peut provoquer la maladie.

➤ **les Toxi-Infections Alimentaires (Les TIA)** : les bactéries responsables de TIA tel que les *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, le botulisme (*Clostridium botulinum*)... ont la capacité de fabriquer des toxines et de les libérer dans l'aliment si les conditions de conservation (Température entre 10 et 63°C, temps longs...) de l'aliment permettent le développement microbien. Lors de la consommation de l'aliment contaminé, la présence des toxines est responsable des symptômes. Etant donné que la toxine est déjà présente dans l'aliment, les symptômes apparaissent très rapidement (quelques heures) après sa consommation de l'aliment [1].

### I.1.3 Principes intoxications alimentaires

#### a) Botulisme

La plus grave des intoxications est due à la toxine botulinique produite par *clostridium botulinum*, bactérie très résistante à la chaleur (détruite seulement si la température est supérieure à 121°C et pendant un temps suffisant). Cette toxine est le poison le plus violent connu. Les produits à

risque sont les conserves et salaisons « familiales » (température de stérilisation insuffisante des conserves). Cette contamination ne donne pas de modification de goût ni d'aspect à l'aliment [2].

**b) *Staphylocoque***

Elles sont dues aux blessures qui s'infectent chez les manipulateurs. Les aliments concernés sont les pâtisseries, la crème pâtissière, la mayonnaise, etc [2].

**c) *Salmonellose***

Concerne les viandes de boucherie, les volailles, les œufs, les ovoproduits et les poissons. La contamination des œufs est le plus souvent le fait d'une contamination externe de l'œuf lors du passage dans le cloaque, et parfois d'une contamination transovarienne de l'œuf lors de sa formation. En effet, il faut conserver les œufs au réfrigérateur, ainsi que tous les produits qui en contiennent (mousses, mayonnaises, œufs en gelée, ...) [2].

**d) *Clostridium perfringens***

C'est un contaminant fréquent des produits alimentaires, notamment ceux d'origine animale. Ces produits peuvent être contaminés soit lors de la phase d'éviscération à l'abattoir, soit à partir de l'environnement souillé, il pousse rapidement dans un milieu à base de viande ou d'amidon, et surtout préparations culinaires réalisées à l'avance et en grande quantités. En fait, dès lors qu'il peut y avoir anaérobiose (c'est-à-dire un développement de micro-organismes en l'absence d'air), une prolifération microbienne se déclenche. Par ailleurs les préparations en grand volume sont particulièrement propices à cet effet, car la ré-oxygénation au contact de l'air ambiant est plus lente que dans les petits volumes [2].

**e) *Bacillus cereus***

Visé particulièrement le riz cuit, les flans et les puddings [2].

**f) *Autres germes***

Notamment ceux de type psychrophile (c'est-à-dire qui se développent au froid, aux environs de 4°C) tels que yersinia enterocolitica (dans bon nombre de produits alimentaires), listeria monocytogenes (viandes et produits carnés, lait et produits laitiers), campylobacter jejuni (volaille, porc, mouton, abats, coquillages, ...) [2].

**g) *Mycotoxines***

Ce sont des substances toxiques élaborées par des champignons au cours de leur métabolisme lorsqu'ils sont placés dans des conditions favorables à la production desdites substances. Parmi celles-ci, on cite les aflatoxines (dans le lait, les produits laitiers, les corps gras,...), la zéaralénone (dans les céréales), la patuline (dans les cidres et jus de pommes) [2].

#### **I.1.4 Différentes sources de contamination**

**a) *Les préparations des denrées relatifs aux méthodes inadéquates de :***

- ✓ Manipulation : Non-respect des normes d'hygiène pour le personnel de cuisine ;

- ✓ Stockage : Denrées non protégées de l'air et des contaminations, Stockage des aliments, dans des lieux souillés, infestés d'insectes ou de rongeur,
- ✓ Préparation ;
- ✓ Conservation : Refroidissement trop lent des produits finis ou réchauffage insuffisant ;
- ✓ ou encore cuisson des aliments ;
- ✓ Mauvaise hygiène du matériel et des locaux, et non-respect des consignes HACCP en général

**b) Le personnel**

- ✓ L'hygiène : corporelle, vestimentaire, et comportementale,
- ✓ les Plaies et les malades : consistent une source importante de contamination des diffusions de germe sur les différents plans,

**c) Les aliments :** la qualité des matières premières qui peuvent être contaminées dès le départ (salmonelles dans les œufs par exemple).

### I.1.5 Méthodes de prévention

5 points majeurs sont à prendre en compte ; il s'agit du respect des bonnes pratiques d'hygiène en relation avec le principe des « 5 M » [3] :

- ✓ **La main d'œuvre :** il est impératif que le personnel se lave correctement les mains avant son entrée en cuisine et entre chaque manipulation (consultez la fiche pratique : lavage des mains). La tenue de travail doit être adaptée et propre (consultez la fiche pratique : tenue vestimentaire).
- ✓ **Le milieu :** un plan de travail et des surfaces propres diminue les contaminations croisées (consultez la fiche pratique : nettoyage et désinfection).
- ✓ **Le matériel :** nettoyage et désinfection après chaque utilisation du matériel à risque (trancheuse à jambon, sorbetière, mixeurs etc...).
- ✓ **Les matières premières :**
  - Contrôle qualitatif et quantitatif à réception ;
  - Lavage des fruits et légumes (vinaigre blanc ou eau de Javel) ;
  - Attention à la viande : une attention particulière doit être observée pour la viande (date de péremption, conservation, traitement : ne pas couper différentes viandes sur la même planche...);
  - Contrôle des températures de stockage, et conditions de stockage adaptées.
- ✓ **La méthode :**
  - Respect de la marche en avant ;
  - Cuisson suffisante des plats, refroidissement et réchauffage éventuel rapide.

## I.2 GENERALITES SUR LES STAPHYLOCOQUES

### I.2.1 Historique

Dans les deux premières communications à l'académie des sciences en 1876 et 1880, Louis Pasteur a révélé et insisté sur l'existence de cette bactérie, qu'il avait isolée à la fois du pus de l'anthrax et de l'ostéomyélite et aussi des eaux de la seine. Ces germes, disposés en grappes de raisin à l'examen microscopique, ont été décrits par Robert Koch en 1878. Ces isolats observés et identifiés en 1879 dans des pus de furoncle et d'ostéomyélite par Pasteur comme étant "un organisme unique, formé de petits points sphériques, réunis par couple, rarement par quatre, mais très fréquemment associés en petits amas ". Ainsi, il les a cultivés en 1880 et disait que "l'ostéomyélite est le furoncle de la moelle épinière ". Ce n'est que plus tard; en 1882 que le nom "Staphylocoque" a été donné par le chirurgien Ogston, pour décrire ces grains (kokkos), groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (Staphylos). Koch, Pasteur et Ogston ont réussi à reproduire des abcès chez l'animal par inoculation des prélèvements de pus. En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries, il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées *S. aureus* et blanches *S. albus* [4].

### I.2.2 Définition

Les staphylocoques sont des bactéries impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers. Elles sont considérées comme un des premiers agents responsables d'infections nosocomiales (infections contractées en milieu hospitalier) mais elles peuvent aussi être contractées en dehors de l'hôpital (infections dites communautaires) [2].

Ils sont omniprésents dans la nature. Ils sont l'une des bactéries les plus importantes parmi la flore naturelle de la peau des mammifères et des oiseaux. Colonisateur de la peau ou des membranes muqueuses, des voies respiratoires, digestives supérieures et urogénitales, ils peuvent se propager facilement entre les animaux et les êtres humains par contact ou à travers les vecteurs. Les différents hôtes des espèces staphylococciques incluent les mammifères, les oiseaux, les primates, les humains, les aliments et les animaux domestiques [5]. Ils étaient principalement connus sous le nom de pathogènes nosocomiaux, mais la fréquence des infections acquises dans la communauté a augmenté depuis des années [6].

Ces bactéries sont des coques Gram positif, immobiles et non sporulés, d'environ 0,5 à 1,5 µm de diamètre. Ils sont généralement groupés par 2, 4, en courtes chaînes ou le plus souvent en «grappes de raisin». Ils ne sont pas capsulés et possèdent, comme les autres bactéries Gram positif, une paroi composée de peptidoglycanes, d'acides teichoïques et de protéines. Ils poussent facilement sur les milieux de culture usuels et forment des colonies rondes, lisses, jusqu'à 4mm de diamètre, qui sont généralement de couleur blanche ou jaune doré (*Staphylococcus aureus*) [2].

### I.2.3 Classification et nomenclatures

Initialement, les staphylocoques furent classés au sein du genre *Micrococcus*. Dans les années 1900, les premières classifications bactériennes officielles distinguèrent les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* tout en les regroupant au sein de la famille des *Micrococcaceae* [6]. Plus récemment, les données de phylogénie moléculaire associées à des analyses chimiques de ces deux genres ont conduit à la création de la famille des *Staphylococcaceae* à laquelle appartient *S. aureus* [7, 8].

Selon la classification de GM Garrity et al. [9]; le phylum Firmicutes (Tableau I.1) est constitué de quatre classes: Clostridia, Mollicutes, Bacilli, Togobacteria. La classe des Bacilli est constituée de deux ordres: Bacillales et Lactobacillales, dont chacun est divisé en quatre familles; Staphylococcaceae constitue la 4<sup>ème</sup> famille des Bacillales, celle-ci comprend un seul genre : Staphylococcus (GC30% - 39%).

Tableau I.1 : Classification hiérarchique du Phylum XIII (Firmicutes) basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADN/ ARN 16S

Phylum XIII	Class I Clostridia	Ordre I Clostridiales	famille des Clostridiaceae famille des Peptostreptococcaceae famille des Eubacteriaceae famille des Peptococcaceae famille des Acidominococcaceae
	Class II Mollicutes	Ordre I Mycoplasmatales	famille des Mycoplasmataceae
		Ordre V Incerta sedi	famille des Erysipelotrichaceae (genre Erysipelothrix)
Firmicutes	Class III	Ordre I Bacillales	famille II des Planococcaceae famille IV des Listeriaceae (genre Listeria et Brochothrix) famille V des Staphylococcaceae (genres Staphylococcus, Gemella...) famille VII des Paenibacillaceae
		Ordre II Lactobacillales	famille I des Lactobacillaceae (genres Lactobacillus, Pediococcus...) famille II des Aerococcaceae famille IV des Enterococcaceae (genres Enterococcus...) famille V des Leuconostocaceae famille VI des Streptococcaceae (genres Streptococcus, Lactococcus)

La classification du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs qui repose sur l'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S et on reconnaît actuellement 45 espèces et sous espèces de staphylocoques, que l'on peut identifier grâce à leurs différents caractères phénotypiques (réactions biochimiques, structure de la paroi) et génotypiques (polymorphisme de restriction, ribotypage et autres) ; ces derniers étant les plus souvent réservés aux études épidémiologiques. Dix-sept de ces espèces sont retrouvés chez l'homme (Tableau I.2) [11], d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments. Parmi celles retrouvées chez l'homme, trois espèces occupent une place privilégiée essentiellement dans la pathologie humaine : *S. aureus*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus* ; les autres sont rarement impliquées [10, 12]. Suite à la description d'une nouvelle espèce ces dernières

années (*Staphylococcus agnetis*), le genre comprend 45 espèces dont 10 sont divisées en deux sous-espèces ou plus .

Tableau I.2 : Espèces constituant le genre *Staphylococcus* [11]

<i>S. agnetis</i>	<i>S. intermedius</i> *
<i>S. arlettae</i>	<i>S. kloosii</i>
<i>S. aureus subspecies aureus</i> *	<i>S. lentus</i>
<i>S. aureus subspecies aneroobius</i>	<i>S. lugdunensis</i> *
<i>S. auricularis</i> *	<i>S. lutrae</i>
<i>S. capitis subspecies capitis</i> *	<i>S. muscae</i>
<i>S. capitis subspecies urelyticus</i>	<i>S. pasteurii</i> *
<i>S. caprae</i> *	<i>S. piscifermentans</i>
<i>S. carnosus subspecies carnosus</i>	<i>S. pulvereri</i>
<i>S. carnosus subspecies utilis</i>	<i>S. saccharolyticus</i> *
<i>S. chromogenes</i>	<i>S. saprophyticus subspecies saprophyticus</i> *
<i>S. cohnii subspecies cohnii</i> *	<i>S. saprophyticus subspecies bovis</i>
<i>S. cohnii subspecies urealyticus</i>	<i>S. schleiferi.subspecies schleiferi</i> *
<i>S. condimenti</i>	<i>S. schleiferi subspecies coagulans</i>
<i>S. delphini</i>	<i>S. sciuri subspecies sciuri</i>
<i>S. epidermidis</i> *	<i>S. sciuri subspecies carnaticus</i>
<i>S. equorum</i>	<i>S. sciuri subspecies rodentium</i>
<i>S. felis</i>	<i>S. simulans</i> *
<i>S. fleurettii</i>	<i>S. succinus</i>
<i>S. gallinarum</i>	<i>S. vitulinus</i>
<i>S. haemolyticus</i> *	<i>S. xylosus</i> *
<i>S. hominis subspecies hominis</i> *	<i>S. warneri</i> *
<i>novobiosepticus</i>	
<i>S. hyicus subspecies hyicus</i>	

\*espèces retrouvées chez l'homme.

Les espèces et les souches du même genre sont pour la grande majorité aéro-anaérobies facultatives, catalase positive, et oxydase négative. La présence d'une enzyme, la catalase, permet de les distinguer des autres bactéries à gram positif et notamment des *Streptococcus spp*, et ce par la présence ou l'absence d'une autre enzyme : la coagulas. Celle-ci est mise en évidence au laboratoire par coagulation du sang. Il existe donc deux sous-groupes : les staphylocoques à coagulas positive (SCP) et les staphylocoques à coagulas négative (SCN).

En raison de la capacité de la coagulas à générer des caillots dans le plasma, les SCP présentent généralement un pouvoir pathogène plus élevé. En revanche, certaines études montrent que l'implication des SCN dans les infections augmente également [14].

- ***Les staphylocoques à coagulas positive (SCP)***

*Staphylococcus aureus* a longtemps été considéré comme le seul représentant des SCP. Cependant, de nouvelles espèces de staphylocoques à coagulas positive ont été récemment isolées: *Staphylococcus intermedius* et *Staphylococcus hyicus* [16]. Lors des toxi-infections alimentaires, le *S. aureus* est le plus pathogène des staphylocoques et le plus fréquemment isolé. Il joue donc un rôle majeur en termes de sécurité des aliments [17].

- ***Les staphylocoques à coagulas négative (SCN)***

Surnommés les staphylocoques blancs, et opposés aux staphylocoques dorés, ils sont considérés comme simple commensaux de la peau et les muqueuses car ils sont omniprésents. Parmi les trentaines d'espèces répertoriés SCN certains sont d'hôte de l'homme, d'autres d'animal, et d'autres d'animal et d'homme au même temps.

Chez l'homme *S.epidermis* domine largement en particulier sur la peau mais sur certains sites, on trouve d'autre espèces comme les :

- ✚ *S. capitis* sur la cuir du cheval ;
- ✚ *S.aucularis* sur les conduits auditifs externes ;
- ✚ *S.hominis* sur les zones sèches ;
- ✚ *S.epidermis* et *saprophytus* sur les muqueuses vaginales.

Ces bactéries sont reconnues par l'absence de la coagulas. De plus, la majorité d'entre eux sont incapables de fermenter le mannitol

Elles sont essentiellement responsables d'infections nosocomiales et iatrogènes, leur virulence est en rapport avec leur capacité d'adhésion aux matériels étrangers car ils élaborent une substance polysaccharidique dénommée « slim » qui facilite les adhérences cathéters, voies veineuse centrale, prothèse vulvaire ou osseuse ; sont les principale porte d'entrés dans le siège des infections qui occasionnent des septicémies bactériémie endocardite [18].

- ***Staphylococcus Saprophyticus***

Fait partie des SCN mais fermente le mannitol comme *S.aureus*. Il est responsable des infections urinaire chez les jeunes femmes.

Sensible à la plupart des ATB à visée urinaire sauf à fosfomycine (résistance naturelle), il résiste aussi à la novobiocine contrairement à la plupart des staphylocoques isolé chez l'homme [19].

### **I.3 STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

#### **I.3.1 Généralités**

*Staphylococcus aureus*, également nommé staphylocoque doré en référence à la couleur or des colonies qu'il forme, a été décrit pour la première fois en 1880 par Louis Pasteur [20]. Il s'agit de l'une des bactéries pathogènes les plus communes et les plus virulentes de la planète.

#### **I.3.2 Habitat**

Le réservoir naturel de *Staphylococcus aureus* est l'homme. Très rapidement après la naissance, *Staphylococcus aureus* colonise la peau, le tube digestif et la région périnatale des nouveau-nés. C'est une bactérie commensale qui appartient à la microflore normale des narines, du vagin, du pharynx, des aisselles et de la peau la plupart du temps sans causer de symptômes particuliers. On estime ainsi que 30 % de la population en est porteuse de façon asymptomatique. On peut également les retrouver dans le sol, dans l'eau, dans le matériel et dans l'alimentation. L'habitat est aussi une source très importante des S.doré. Cependant, lorsque les staphylocoques adhèrent aux tissus ou traversent dans la circulation sanguine de l'hôte, des infections apparaissent conduisant à des pathologies diverses [17, 21, 22].

#### **I.3.3 Caractère morphologique**

D'un point de vue macroscopique, cette bactérie se caractérise par la pigmentation dorée de ses colonies, justifiant le nom vernaculaire de « staphylocoque doré ». *S. aureus* se présente sous forme de cocci en petits amas, de diplocoques ou de très courtes chaînettes, mesurant 0,5 à 1  $\mu\text{m}$ , gardant le Gram (Figure I.1). Sur les cultures en milieu solide, il se dispose en "grappes de raisin", alors qu'en milieu liquide, il est souvent isolé, en diplocoques en tétrades ou en court chaînette (3-5 éléments).

Il est immobile, non sporulé et ne possède pas de capsule visible au microscope optique sauf de très rares souches. Généralement, ils sont capsulés in vivo qui perdent progressivement leur capsule en culture d'autres souches formant des colonies mucoïdes entourées d'une pseudo capsule [23].

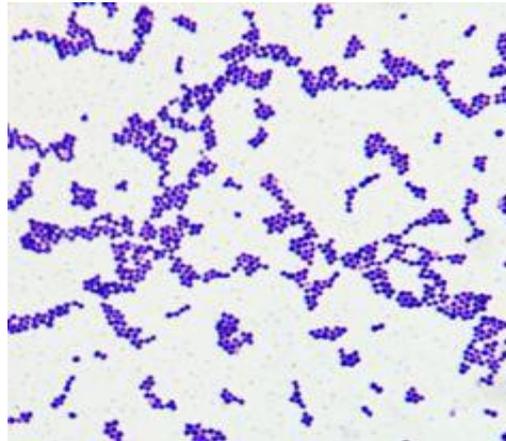


Figure I.1 : *Staphylocoque Aureus* en amas (coloration de gram)

### I.3.4 Caractères cultureux

Le *Staphylococcus aureus* est un germe aéro-anaérobie facultatif, mésophile. Il peut se développer de 6°C à 48°C avec un optimum à 37°C. Cependant, la toxinogénèse n'est possible qu'entre 10°C et 45°C. Cette bactérie peut se multiplier pour des valeurs de pH comprises entre 4,2 et 9,3, avec un optimum de croissance de 7 à 7,5 [25].

Cette bactérie est halophile, avec une concentration en sel assez importante (jusqu'à 15 %) [26]. La croissance des staphylocoques est absente pendant 10 et 16 heures à respectivement 18 °C et 12 °C. En revanche, le développement devient significatif à 22 °C (x5 en 10h) et 32 °C (x40 en 10h). Ces différences s'expliquent par le substrat utilisé lors des tests en laboratoires : dans la plupart des études, il s'agit d'un bouillon de culture [21, 26].

### I.3.5 Sensibilité

Les *staphylocoques aureus* sont sensibles à :

- la chaleur : destruction par la pasteurisation. Cependant certains composants des aliments peuvent protéger *S. aureus* de la chaleur (lipides, protéines, sucres, sels) ;
- la microflore compétitive : leur développement est alors inhibé ;
- l'acidité : pH < 4 pour la croissance et pH < 5 pour la toxinogénèse.

### I.3.6 Résistance

Les *staphylocoques aureus* résistent au lysozyme, au NaCl (ils peuvent se développer en présence d'une concentration en NaCl allant jusqu'à 10%), à la congélation et aux aw réduits [27].

### I.3.7 Caractères structuraux

Comme chez la majorité des bactéries Gram positives, l'enveloppe de *S. aureus* est composée d'une seule membrane plasmique recouverte d'une paroi épaisse riche en peptidoglycane et en acides téichoïques qui sont d'importants motifs de reconnaissance associés au pathogène et impliqués dans l'activation de la réponse immunitaire innée. La plupart des isolats infectieux possèdent également une capsule polysaccharidique externe contenant divers facteurs de virulence et permettent le sérotypage des souches.

Plus de 90% des isolats cliniques possèdent également une capsule externe de nature polysaccharidique rarement présente lors de culture *in vitro*. Sa composition permet de distinguer 11 sérotypes de staphylocoques plus ou moins virulents. Chez l'Homme par exemple, les sérotypes 5 et 8 sont responsables quant à eux seuls de 75% des infections. De plus *S. aureus* présentes de nombreuses protéines de surface possèdent certaines caractéristiques communes, et semblent ainsi jouer une part importante dans la colonisation des tissus de l'hôte [28].

### I.3.8 Caractère biochimique

Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Ainsi, les souches de *S. aureus* sont: indole -, acétone +, uréase +, réduisant le téllurite de potassium et les nitrates en nitrites, et produisent de l'ammoniaque à partir de l'arginine. De plus, la plupart des souches de *S. aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque [29].

*S. aureus* possède également un équipement enzymatique lui permettant de métaboliser de nombreux et divers substrats glucidiques, protéiques et lipidiques [30]. En effet, la plupart des sucres sont fermentés tels que le glucose, le saccharose, le lévulose, le lactose et le mannitol. L'utilisation du mannitol est une indication importante car ce polyalcool est fermenté par *S. aureus* et *S. epidermidis* [29, 31]. Cependant, ce qui caractérise mieux l'espèce *S. aureus*, c'est la production d'une staphylo-coagulas (Tableau I.3) [32]. Toute fois, certaines souches de *S. aureus* peuvent ne pas produire de coagulas libre en raison d'une mutation. Ainsi, une DNase thermostable permet de déterminer si le germe isolé est un *S. aureus*.

Tableau I.3 : Caractères distinctifs de *Staphylococcus aureus*

	Espèce <i>S. aureus</i>	Autres espèces de staphylocoque
Aspect de colonies	Pigment doré	Blanche
Milieu Chapman	Acidification du mannitol (jaune)	Pas d'acidification du mannitol (rouge) sauf l'espèce <i>S.epidermis</i>
Staphylo-coagulas	Positive	Négative

### I.3.9 Physio pathogénie

La virulence est la survie de *Staphylococcus* dans l'hôte. Elle est liée à sa capacité d'envahir les tissus de l'hôte et d'échapper aux systèmes de sa défense et à la production d'une diversité de réseau de protéines (c'est-à-dire facteurs de virulence) dont beaucoup d'entre ont été identifiés avec le processus particuliers des maladies. En revanche, la capacité de produire une maladie par *S. aureus* ne dépend pas d'un seul facteur virulence mais de multiples facteurs impliquant un processus [33].

Sur la base du rôle postulé à *S. aureus*, les facteurs de virulence sont regroupés dans les catégories suivantes [34]:

- a) **Composants de la surface microbienne** : ce sont les facteurs qui aident à l'attachement, reconnaissant ainsi la molécule de matrice adhésive (MSCRAMM) et qui favorisent l'adhésion aux cellules hôtes (protéines de liaison à la fibronectine, protéines liant le fibrinogène, protéines liant le collagène) [35].
- Pili : aide à l'adhérence aux cellules épithéliales de l'hôte, considéré dans de nombreux cas une exigence préalable à l'infection [35].
  - Micro capsule : c'est une combinaison d'antigènes O, K et Vi. l'antigène O correspond à la paroi cellulaire de beaucoup des bactéries Gram négatives. Les antigènes K sont sensés réduire les microorganismes tués après la phagocytose. L'antigène Vi est censé interférer avec l'activité bactéricide du sérum et aussi la phagocytose [35].
  - Macro capsule : c'est le composant mucoïde de la paroi cellulaire bactérienne. Ce composant favorise l'adhérence des microorganismes à la cellule hôte. Il protège également la cellule de la phagocytose et d'autres agents nuisibles [35].
- b) **Enzymes favorisant la dissémination dans l'hôte** :
- Adhésines : ce sont des protéines de surface qui favorisent la colonisation de tissus de l'hôte [36]. Cellules de *S. aureus* peuvent exprimer plusieurs protéines de surface pour aider les bactéries à se fixer sur les cellules hôtes. La laminine et la fibronectine sont deux composantes principales formant une matrice extracellulaire sur l'épithélium ou les surfaces endothéliales. Ce sont des facteurs agglomérant qui peuvent aider les cellules bactériennes à joindre au caillot sanguin et les tissus traumatisés [37].
  - Invasine : ce sont un groupe de protéines extracellulaires qui favorisent la propagation dans les tissus, tels que la leucocidine, la kinases, et la hyaluronidase [38].
  - Hyaluronidase : il se décompose de la substance intracellulaire, l'acide hyaluronique, facilitant ainsi la propagation d'une infection chez l'hôte.
  - Kinase : Cette enzyme décompose les caillots sanguins ainsi aidant l'organisme à un étalement l'infection [38].
  - Collagénase : similaire à la kinase, mais celle-ci décompose les fibres du collagène [38].

- Neuromidase : c'est une enzyme qui hydrolyse les mucopolysaccharides qui sont le matériel intracellulaire de liaison des cellules hôtes [38].
  - Thermonucleas : ce sont des enzymes capables d'hydrolyser le DNA et le RNA; leur action s'exerce à pH alcalin en présence de calcium. La désoxyribonucléase thermostable (thermonucléase) est produite par toutes les souches de *S. aureus*, ainsi que par environ 5% de souches de staphylocoques à coagulas-négative, appartenant aux espèces *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis* et *S. schleiferi*, alors que celle des autres espèces bactériennes est thermolabile. Ces nucléases interviennent dans la formation des lésions tissulaires [38].
- c) **Facteurs aidant à échapper au système immunitaire de l'hôte** : généralement ce sont des facteurs de surface qui inhibent la phagocytose par cellules présentatrices d'antigènes. *S. aureus* peut produire divers facteurs essentiellement la protéine A, qui est une protéine caractéristique de l'espèce *S. aureus*, constitutive de la paroi et insoluble à l'état natif, est la plus importante déterminante de la virulence. Elle peut se lier à IgG moléculaire de l'hôte à une mauvaise orientation, ce qui conduit au dysfonctionnement de la protéine de liaison IgG et éventuellement la perturbation de la phagocytose [39].
- Catalase : elle inhibe la bactéricidie intraleucocytaire en empêchant la formation, par les globules blancs, de radicaux oxygénés toxiques pour la bactérie.
  - Coagulas lié : c'est une protéine extracellulaire qui se lie à la prothrombine de l'hôte. La thrombine ainsi activée transforme le fibrinogène en fibrine. C'est un marqueur de l'identification de *S. aureus* (test de la coagulas en tube). Il n'existe pas d'argument évident indiquant un rôle de la coagulas dans la virulence des souches [44].
  - Coagulas libre : c'est une exoenzyme, libérée dans le milieu au cours de la culture par *Staphylococcus aureus*. Sa mise en évidence permet seule, d'affirmer la présence de *S. aureus*. Cette enzyme est capable in vitro de coaguler le plasma de lapin [44].
- d) **Facteurs possédant des activités cytolytiques** : ce sont des substances qui endommagent la membrane de la cellule hôte :
- Hemolysine : provoque la lyse des globules rouges, squelettes, muscles, plaquettes lysosomes, leucocytes provoquant des nécroses menant à la mort [39].
  - Lecitinase : une enzyme lipolytique qui attaque les phospholipides et provoque la lyse des cellules du tissu, globules rouges et les leucocytes [39].
  - Leucocidine : est l'un des principaux facteurs de virulence dans *S. aureus*, et est une protéine à plusieurs composants, produits séparément, agissant en même temps en tant que toxine en formant des pores dans la membrane. L'objectif de ce facteur de virulence est leucocytes polymorphonucléaires [39].
- e) **Exotoxines induisant des réponses immunitaires anormales ou intoxication alimentaire (entérotoxine staphylococcique, syndrome du choc toxique)** :
- Superantigène: les superantigènes sont des molécules qui se fixent de manière non spécifique au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, induisant ainsi l'activation polyclonale non spécifique d'un grand nombre de lymphocytes T,

provoquant ainsi une réaction immunitaire très importante et disproportionnée qui peut mener à un choc septique. La TSST-1 et plusieurs types d'entérotoxines ont une activité superantigénique [40].

- **Toxines exfoliatives** : sont des serine-protéases épidermolytiques impliquées uniquement dans certaines pathologies cutanées spécifiques, exprimées uniquement par les kératinocytes situées au niveau de la couche granuleuse de l'épiderme. Leur action provoque sur le plan histologique un décollement entre le stratum granulosum et le stratum spinosum créant, cliniquement, des lésions bulleuses [41].
- **Intoxication** : les entérotoxines staphylococciques (SE) ont initialement été définies par leur capacité à causer des intoxications alimentaires. Le *Staphylococcus aureus* peut produire de nombreuses entérotoxines : SE A, B, C, D, E, G, H, I, R et T. Ces toxines peuvent se retrouver dans les aliments lorsque ceux-ci sont contaminés par des souches de *Staphylococcus aureus* entérotoxigènes. Lorsqu'elles sont ingérées, ces toxines se révèlent fortement émétisantes. Elles représentent l'une des principales causes de toxi-infections alimentaires. Si l'activité de super-antigène de ces toxines est bien caractérisée, le mécanisme conduisant à l'activité émétisante n'est pas encore clairement élucidé [42].
- **Toxine du Syndrome du Choc Toxique Staphylococcique (SCTS)** : est une exotoxine d'origine chromosomique, fortement protéolytique mais peu ou pas hémolytique. Elle se fixe spécifiquement sur des cellules humaines épithéliales conjonctivales et survient chez des sujets réceptifs dépourvus d'anticorps anti TSST- 1 [39].

f) **Composants résistants aux antibiotiques** : ce sont des facteurs qui agissent comme immuno-modulateurs. Le *S. aureus* peut également acquérir une résistance aux antimicrobiens par plasmide et d'autres des éléments mobiles. Plus d'un gène de résistance aux antibiotiques peuvent être situés à *S. aureus* simultanément et conduisent à une résistance à des médicaments multiples (33). De plus, les systèmes de pompes à efflux fonctionnent également comme des éléments de résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* [34-35].

### I.3.10 Régulation génique des facteurs de virulence

Il existe un très grand nombre de gènes liés à la virulence : au moins 40 gènes codant pour des toxines, 20 codant pour des facteurs d'adhésion et 44 régulant la transcription de produits associés à la virulence. Les gènes codant pour les toxines sont regroupés dans des îlots de pathogénicité qui sont des éléments génétiques mobiles. Près de 75% des souches cliniques de *S. aureus* ont des gènes codant pour des toxines.

La synthèse des facteurs de virulence est biphasique. A la phase initiale de la croissance bactérienne, ce sont surtout les gènes codant pour des adhésines qui sont activés. Secondairement, les gènes des toxines prennent le relais. Cette activation séquentielle est sous la dépendance du système de régulation de la virulence appelé agr (accessory gene regulator).

Le système agr met en jeu un mécanisme de déclenchement par seuil « quorum sensing » : il code pour un peptide (peptide auto - inducteur) qui est sécrété dans l'espace extracellulaire et son accumulation agit comme un signal sur la densité cellulaire conduisant à l'activation du système agr [39, 43].

### I.3.11 Pouvoir pathogène

➤ **Chez l'homme**, le *S.aureus* peut être responsable de deux types de syndromes ; les infections suppuratives et les toxi-infections alimentaires ou les toxémies staphylococciques. Ces dernières regroupent le choc toxique, la maladie exfoliante généralisée, les toxi-infections alimentaires et la pneumonie nécrosante. Ces infections sont appelées toxémies staphylococciques car elles sont liées à des toxines spécifiques. Ces toxines sont soit produites à partir d'un foyer infectieux ou de colonisation, soit préformées dans un aliment contaminé [44].

Le choc toxique est provoqué par la diffusion de l'exotoxine TSST-1 ou de certain entérotoxine , la particularité de ces derniers est d'être des super antigènes entraînant l'activation des lymphocyte T. Ce dernier libère brutalement et massivement des cytokines pro-inflammatoires responsables du choc. Ce syndrome s'accompagne d'une fièvre supérieure à 39°C, hypotension artérielle, et une érythrodermie scarlatiniforme généralisée [44].

Les intoxications alimentaires à *S. aureus* sont provoquées par l'ingestion de toxines superantigéniques staphylococciques, qui sont toutes émétisantes, excepté la TSST. Les entérotoxines responsables sont alors préformées dans l'aliment contaminé. Comme elles sont thermostables et résistantes à la pepsine stomacale, elles ne sont détruites ni par la cuisson de l'aliment, ni par l'acidité de l'estomac [44].

➤ **Chez l'animal**, ce sont les *Staphylococcus intermedius* (pathogène du chien, furunculoses) et *Staphylococcus hyicus* (pathogène du porc, dermatites exsudatives). Ces bactéries sont rarement associées à des infections humaines, néanmoins *S. intermedius* peut être transmis à l'homme par morsures (plaies infectées) et être associé à des bactériémies (bactéries dans le sang). Quelques cas de bactériémies humaines à *S. hyicus* ont également été observés, essentiellement chez des personnes en contact avec des élevages porcins [44].

### I.3.12 Sensibilité et résistance aux ATB

Les staphylocoques peuvent être sensibles à divers antibiotiques. Cependant, ils se caractérisent par une aptitude remarquable à acquérir de multiples caractères de résistance. Actuellement, environ 95% des souches sont résistantes à la pénicilline G, aux aminopénicillines, aux carboxypénicillines et aux uréidopénicillines [45].

Le traitement des infections graves à *S. aureus* ne peut se faire sans une étude approfondie au laboratoire de la sensibilité de la souche, en particulier pour déterminer quelles sont les meilleures associations [45].

### I.3.13 Diagnostic

L'identification de *S. aureus* est basée sur la mise en évidence de la coagulas à partir de plusieurs colonies prélevées sur milieu BP (Baird-Paker). Chaque colonie est ensemencée dans 0,5 ml de bouillon cœur-cerveille. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, on ajoute 0,5 ml de plasma de lapin et le mélange est incubé à 37 °C puis examiné périodiquement jusqu'à 24 heures d'incubation. La présence de coagulas se traduit par une prise en masse du milieu [46].

Selon les normes, l'identification de *S. aureus* se limite à la détection d'une coagulas. Une identification plus précise peut être obtenue par la recherche de caractères complémentaires (clumping factor, nucléase, galerie de tests biochimiques). Une identification moléculaire est possible à l'aide de sondes nucléiques. Une hybridation des fragments de restriction de l'ADN bactérien avec une sonde universelle d'ADNr ou d'ARNr permet d'obtenir des profils, appelés en l'occurrence des ribotypes, spécifiques d'espèce [46].

Plus récemment, de nombreuses techniques basées sur une amplification génique (Polymérase Chain Réaction, PCR) ont été développées. Elles ciblent un gène, une portion de gène ou une séquence intergénique spécifique de *S. aureus*. La détection des gènes d'enterotoxines staphylococciques, détaillée plus loin, est particulièrement intéressante en bactériologie alimentaire puisqu'elle permet à la fois d'identifier *S. aureus* et d'évaluer son potentiel entérotoxigène [46].

La présence des entérotoxines staphylococciques peut être mise en évidence par des tests immunologiques : immunofluorescence, électro-immunodiffusion, hémagglutination, double diffusion en lame, RIA, ELISA [46].

La recherche de l'entérotoxine doit être effectuée dans les produits car une production de toxines peut précéder un traitement antimicrobien et donc la mort des staphylocoques [47].

### I.3.14 Traitement et prévention

#### a) Prévention

La prophylaxie est à la fois importante et difficile dans les hôpitaux, dans la mesure où le staphylocoque peut survivre des mois dans les poubelles, les rideaux et le linge de maison et où le portage humain est souvent permanent. L'antibioprophylaxie, rarement utilisée comme moyen de prévention, doit être exceptionnelle et réservée à des cas particuliers (chirurgie cardiaque et orthopédique), telles les suppurations localisées qui peuvent parfois nécessiter un geste chirurgical. Ainsi, la prévention des infections nosocomiales repose sur l'application des mesures d'asepsie rigoureuses et le strict respect d'hygiène individuelle (traitement des lésions pouvant représenter une porte d'entrée à des infections plus graves) et collective (lutte contre l'infection dans les hôpitaux, surveillance des cuisines, etc.).

La contamination par les staphylocoques d'origine animale peut être réduite par le contrôle des mammites bovines, et en évitant les contaminations croisées entre peau et carcasse à l'abattoir

puis entre aliments crus et cuits à la cuisine. Les staphylocoques présents dans l'environnement et sur les ustensiles de cuisine peuvent être éliminés par nettoyage et désinfection [46].

Les TIA à staphylocoques peuvent être évitées à condition de respecter les règles d'hygiène tout au long de la chaîne alimentaire et spécialement lors de la préparation des repas. La contamination des aliments par des staphylocoques d'origine humaine peut être minimisée par l'éloignement des personnes infectées de la préparation des denrées, par la réduction des manipulations, par la propreté et les bonnes pratiques des manipulateurs. Ceux-ci doivent être convenablement informés de l'existence des microbes afin d'être sensibilisés aux problèmes d'hygiène [47].

### **b) Traitement**

Les antibiotiques ont modifié le pronostic des infections graves comme la staphylococcie maligne de la face, les infections systémiques à staphylocoques, etc. Que ce soit à *S. aureus* ou *S. epidermidis*, les infections doivent être traitées par une antibiothérapie bactéricide. Le choix de l'antibiothérapie sera guidé en milieu hospitalier par l'antibiogramme [23, 39].

Pour les infections graves, les pénicillines insensibles aux pénicillinases sont utilisées, comme l'oxacilline, la cloxacilline, la flucoxacilline et les céphalosporines de première et deuxième génération comme la céfalotine, la céfalexine et la céfuroxime. De nombreuses souches isolées en milieu hospitalier dans le monde entier sont résistantes à toutes les bêta-lactamines (souches méti R) et sont de règle multirésistantes. Ces souches doivent être traitées par les glycopeptides qui restent fréquemment actifs, mais sont aussi plus lentement bactéricides et plus coûteux. L'érythromycine et les nouveaux macrolides sont employés dans les infections peu sévères. La mupirocine est réservée à l'usage local. Elle est utilisée pour éradiquer le portage nasal de *S. aureus* [23, 39].

## **I.4 STAPHYLOCOQUE ET DANGERS ALIMENTAIRE**

En raison de sa présence dans une variété d'aliments, son omniprésence, sa capacité à produire des toxines et des enzymes et sa haute tolérance au sel, le *S. aureus* est un agent pathogène de la nourriture et de l'alimentation d'importance clinique considérable, classé comme la deuxième maladie alimentaire la plus fréquente au monde [49]. Environ 25% de toutes les maladies d'origine alimentaire déclarées aux États-Unis sont causées par l'intoxication staphylococcique [24].

L'empoisonnement alimentaire staphylococcique résulte de la consommation d'aliments contaminés par une ou plusieurs entérotoxines staphylococciques (SE). Ils sont en mesure de favoriser la perte d'eau des petites muqueuses intestinales entraînant des vomissements et de la diarrhée [24].

Les entérotoxines produites par certaines souches lorsque les conditions du milieu sont favorables, préformées et libérées dans l'aliment sont des protéines thermostables pouvant

résister à des traitements thermiques de type stérilisation. Elles sont à l'origine du risque alimentaire entraînant des intoxications à la suite de leur ingestion (TIA = Toxi-Infection d'origine Alimentaire). En revanche, la présence des formes végétatives seules, sans toxine dans l'aliment, n'entraîne aucun risque pour le consommateur en bonne santé. La toxinogénèse nécessite des conditions plus strictes que la croissance bactérienne [24] telles que :

- la souche entérotoxigène de staphylocoques ;
- la température comprise entre 10 °C et 45 °C, avec un optimum entre 34 et 40 °C ;
- le pH compris entre 5 et 9,6 (optimum entre 7 et 8) ;
- la quantité et activité des ferments et de la flore antagoniste insuffisantes ;
- la concentration en sel faible et disponibilité de l'eau trop (Aw) élevée ;
- la condition d'aérobiose uniquement [16, 24].

L'obtention d'une quantité suffisante de toxines pour provoquer une TIA nécessite un grand nombre de *Staphylococcus aureus* (plus de  $10^6$  à  $10^7$  ufc (Unité Formant Colonie)/g ou ufc/mL. Les toxines identifiées lors de TIA sont les types A à E et les plus courantes sont les types A et D (qui peuvent être associés). Lors d'intoxications provenant exclusivement de *Staphylococcus aureus*, la plupart des souches de staphylocoques incriminées sont d'origine humaine (environ 80 %) [16, 24].

Une intoxication alimentaire pourrait se produire si les aliments contaminés n'ont pas été conservés dans la bonne température. Divers produits alimentaires sont fréquemment contaminés par *S. aureus* et incriminés pour intoxication alimentaire :

- ✓ les viande et produits à base de viande comme le bœuf et les saucisses de porc ;
- ✓ le poisson et les produits de la pêche comme les salades de thon, les salades de saumon et autres aliments prêts à consommer ;
- ✓ les produits de volaille comme les salades de dinde, les œufs, les rouleaux d'œufs, salades d'œufs et poulet ;
- ✓ les produits laitiers tels que les fromages ;
- ✓ les légumes et autres produits transformés tels que garnitures sandwiches ;
- ✓ les produits de boulangerie à savoir la crème ou la crème anglaise, les portions, et les chocolat éclairs qui sont fréquemment contaminées, car ils sont un très bon moyen de croissance pour l'organisme ;
- ✓ Le jambon est également l'un des aliments les plus courants souvent impliqués dans le SFP [16, 24].

Les animaux comme le porc ou la vache peuvent servir de réservoir et/ou véhicule de transmission de propagation de ce pathogène. Les produits alimentaires dérivés des animaux peuvent être contaminés par *S. aureus* pendant l'abattage et le système de transformation des ces aliments.

En outre les manipulateurs d'aliments, les équipements et les surfaces de l'environnement sont également responsables de la contamination par *S. aureus*. Les microorganismes peuvent être véhiculée dans les lieux anatomiques des manipulateurs d'aliments, permettant d'élaborer des toxines pendant le traitement ou le stockage du produit [11, 12, 24].

Les symptômes d'intoxication alimentaire par *S. aureus* se produisent rapidement dans les 2 à 6 heures suivant la consommation d'aliments contaminés. Les patients éprouvent des vomissements signe caractéristique, de la diarrhée, des crampes abdominales, des céphalées et de la nausée mais sans fièvre., [12]. La guérison intervient généralement dans les 24 heures et les hospitalisations sont assez rares, principalement dues à des déshydratations.

SFP peut être prévenu ou minimisé par suite à de bonnes pratiques sanitaires dans les domaines de la transformation des aliments, de l'emballage et du stockage. Ils doivent donc limiter l'apport des staphylocoques et empêcher la toxinogénèse [24]. S'assurer que les manipulateurs de nourriture suivent une bonne hygiène personnelle et sont conscients des conséquences peut également minimiser le risque [49].

En règle générale, toute technologie alimentaire pratiquée dans une zone de température "dangereuse" doit être de courte durée ou bien doit faire appel à d'autres paramètres que la température (flore inhibitrice, atmosphère modifiée, additifs, Aw, pH) pour arrêter la multiplication de *S. aureus*. Les contrôles bactériologiques doivent être effectués régulièrement permettent de surveiller le niveau des contaminations et de prévenir les accidents [49].

La présence de *staphylocoques* à coagulas positive correspond à un critère d'hygiène des procédés. Avec un nombre de bactéries inférieur à  $10^5$  ufc/g de SCP, le risque pour le consommateur est considéré comme acceptable et le lot peut être commercialisé. Si le résultat est supérieur à ce seuil, une recherche de toxines doit être effectuée et le lot ne peut être mis sur le marché qu'après une analyse négative (absence de toxines) [49].

Les caractéristiques générales de la bactériologie des staphylocoques étant exposées, il est nécessaire de s'intéresser à leur origine et leur développement (Tableau I.4) [50].

Tableau I.4 : Pratique et produits responsable des TIA staphylococcique

Pratiques responsables	<p>Conditions requises pour que des aliments puissent déclencher une intoxication staphylococcique :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Contamination des aliments au cours de la manipulation des aliments par un porteur sain ou une personne infectée.</li> <li>• Aliment riches en protéines et peu acides, comme la viande, les œufs, la crème, la mayonnaise et les salaisons puisque la bactérie tolère bien le sel et les nitrites.</li> <li>• Séjour de l'aliment à une température de 15 à 45 °C pendant quelques heures, cette condition est remplie lors de pique-niques, buffets ou réceptions pour lesquels des aliments sont préparés longtemps à l'avance et maintenus à la température de la pièce.</li> </ul>
Aliments responsables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Jambon, volailles, viande hachée, sauces, sandwichs et salades d'œufs, de mayonnaise, de pommes de terre, de thon ou de fruits de mer, mets chinois</li> <li>• Pâtes alimentaires, pâtisseries renfermant de la crème</li> <li>• Lait cru et produits laitiers fabriqués à partir de lait ou de crème contaminés</li> </ul>

## **I.5 REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)**

### **I.5.1 Historique et définition**

En 1983, Kary Mullis, chercheur d'une firme biotechnologique américaine « CETUS », met au point une nouvelle technique d'amplification de l'ADN: la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne). La PCR est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments. En effet, il s'agit d'une polymérase isolée à partir d'une bactérie thermophile vivante dans les geysers du parc de Yellowstone (Etat-Unis). Actuellement, cette technique est incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires biologiques possédant plusieurs appareils à PCR. Les applications commerciales de la PCR sont en effet immenses : séquençage des génomes, détection des maladies génétique, étude de l'ADN fossile, ... [51].

### **I.5.2 Principe de la PCR**

La PCR est une suite de cycles, qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte. En moyenne, une PCR comporte entre 20 et 40 cycles. Au cours de la PCR de courtes séquences d'ADN (oligonucléotides) sont utilisées comme des amorces par l'enzyme de réplication. Cette enzyme permet de repérer le fragment d'ADN ou de gène précis, puis de le multiplier rapidement. Cette polymérisation est artificiellement obtenue en imposant des cycles thermiques à un mélange constitué de l'ADN matriciel (issu de l'échantillon à tester), des dNTP (désoxynucléotides triphosphate, c'est à dire les dATP, dCTP, dGTP et dTTP), d'un tampon adéquat, d'un couple d'amorces et de la Taq polymérase. La PCR est en fait, la répétition de 3 étapes thermiques réalisées successivement dans un même tube [51].

### **I.5.3 Eléments de la PCR**

Plusieurs éléments participent à la réalisation de la PCR à savoir [51].

#### **a) L'ADN**

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser (salive, cheveux, cellules, fossile, ...). Puis, cet extrait purifié en ADN, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR.

#### **b) Les amorces**

Ce sont des fragments courts d'ADN, capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces sont choisies de façon à

encadrer la séquence d'ADN à amplifier. La taille de ces amorces est généralement d'une vingtaine de désoxyribonucléotides. De plus, les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier.

#### **c) Les DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**

Les dNTPs (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, utilisés par la Taq polymérase pour la synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire.

#### **d) L'enzyme, Taq polymérase**

L'enzyme utilisée est une polymérase, c'est-à-dire qu'elle peut synthétiser un nouveau brin d'ADN à partir du brin d'ADN matrice après s'être fixée à une amorce.

#### **e) Le milieu réactionnel**

Le milieu réactionnel de la PCR comporte l'ADN à amplifier, les dNTPs, les deux amorces, la Taq polymérase, un tampon et des ions magnésium ( $MgCl_2$ ). Ces deux derniers composants définissent un milieu avec un pH optimal et une concentration saline optimale pour le bon fonctionnement de l'enzyme.

### **I.5.4 Réaction de la PCR**

La réaction de PCR se fait dans un thermocycleur. L'appareil contient un bloc chauffant où l'on insère les tubes contenant notre mélange pour la réaction de PCR et où la température peut varier très rapidement et très précisément de 0°C à 100°C.

Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie. Ces deux paramètres, température et temps, dépendent de la taille de la séquence à amplifier de la taille et de la composition en désoxyribonucléotides des amorces [52-54].

Clavier pour la programmation  
des cycles



Figure I.2 : Thermocycleur

#### **a) Dénaturation**

La température dans le tube est réglée à 95°C. A ce moment là, l'ADN se dénature. En effet, l'ADN perd sa structure caractéristique en double hélice ; les liaisons hydrogène reliant les bases

de chaque brin d'ADN étant instables à cette température. L'ADN double-brin (2 brins) est dénaturé en ADN simple brin (Figure I.3).

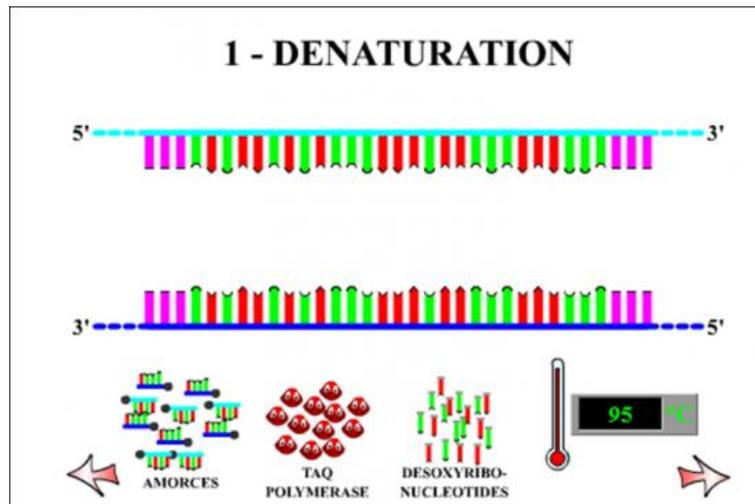


Figure I.3 : phase de

### b) Hybridation

Ensuite la température est descendue à la température dite d'hybridation. Cette dernière est généralement comprise entre 50°C et 60°C et elle est fonction de la composition en désoxyribonucléotides (dATP, dTTP, dGTP, et dCTP) des amorces. Les amorces reconnaissent et se fixent à leurs séquences complémentaires en reformant des liaisons hydrogènes. On dit que les amorces s'hybrident au brin d'ADN (Figure I.4).

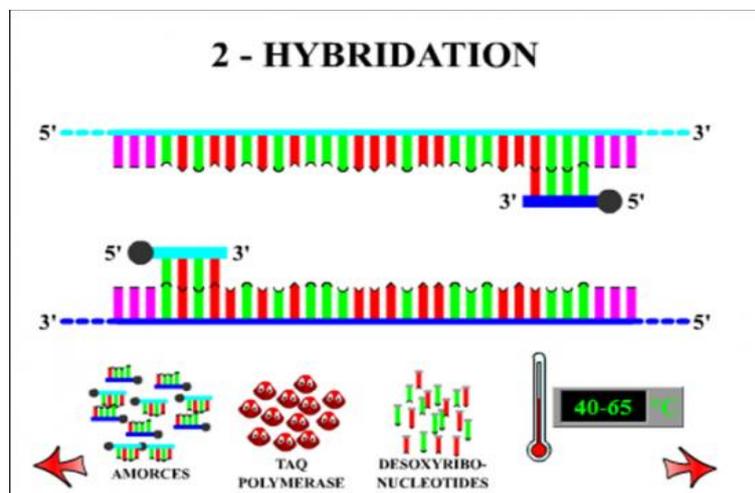


Figure I.4 : Hybridation de

### c) Elongation

A la température 72°C (température idéale), la Taq polymérase s'active. Cette dernière est une enzyme thermorésistante. Elle peut résister à des températures allant jusqu'à 100°C. Cette Taq polymérase est extraite d'une bactérie extrémophile, *Thermus aquaticus*, qui ne vit que dans les

sources chaudes. Thomas Brock découvre en 1969 dans le plus grand geyser du monde, le Steamboat Geyser, au parc de Yellowstone aux Etats-Unis. Cette étape permet à la Taq polymérase de synthétiser le brin complémentaire à l'ADN matrice, grâce aux dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel (Figure I.5).

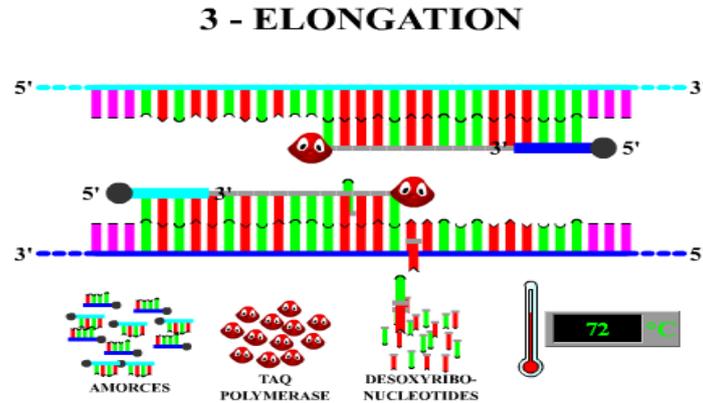


Figure I.5 : Phase d'élongation

Au cycle suivant (Figure I.6), les nouveaux fragments synthétisés servent à leur tour de matrice pour la synthèse de nouveaux fragments d'ADN. En théorie, à la fin de chaque cycle la quantité d'ADN cible est doublée. Le premier cycle est fini et voilà qu'un nouveau cycle recommence. Cela se reproduira 30 fois (en fonction du protocole de PCR) comme vous pouvez le voir sur le schéma. A partir d'une copie d'ADN cible, on pourra donc obtenir 1 milliard de copie d'ADN cible.

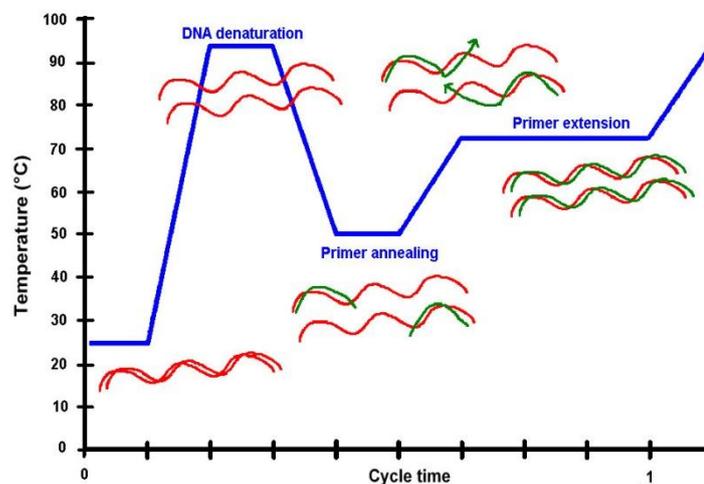


Figure I.6 : Différents thermocycles de la PCR

### I.5.5 Applications de la PCR

- ✚ La recherche d'une pathologie : En parasitologie, bactériologie (ex : tuberculose), virologie, oncologie (gènes impliqués dans la cancérogenèse), on met en évidence

l'absence, ou la présence, dans le prélèvement d'un fragment d'ADN spécifique de l'agent causal [53].

- ✚ Le diagnostic des maladies héréditaires (diagnostic anténatal) : par l'identification sur un gène d'une mutation connue et identifiée (ex : mucoviscidose «maladie des mucus visqueux») ou d'une délétion, responsable et caractéristique de la maladie recherchée [53];
- ✚ Recherche d'OGM ;
- ✚ Détection de polymorphismes ;
- ✚ Séquençage ;
- ✚ Recherche de paternité.

Grâce à son universalité, la PCR a conquis une place prépondérante en biologie moléculaire et concerne en particulier, tous les aspects de la biologie moléculaire appliquée à la médecine. Son apparition a représenté un progrès méthodologique décisif [54].

## Chapitre II

# MATERIEL ET METHODES

## II.1 PRESENTATION DE L'INSTITUT PASTEUR D'ALGERIE

L'Institut Pasteur d'Alger fut créé en 1894, à l'initiative des Docteurs J. Baptiste Paulin TROLARD et Henry SOULIE. L'Institut Pasteur d'Algérie fait en outre partie actuellement du Réseau International des Instituts Pasteur (RIIP), dont la coordination est assurée par l'Institut Pasteur de Paris. Leur objectif commun est d'élaborer un programme de coopération scientifique notamment pour la protection de la santé publique, en particulier pour la surveillance et le contrôle épidémiologique des maladies infectieuses et parasitaires (Sida, grippe, tuberculose, paludisme, choléra, ...) et la participation aux grands programmes internationaux ou régionaux de recherche.

L'Institut Pasteur a pour tâches principales l'analyse et prestation de service comprenant l'analyse demandée par les services vétérinaire officiels, les inspections programmées, avec plans de surveillance adaptés à la restauration collective et aux organismes hôteliers et investigations relatives aux toxi-infections alimentaires de collectivités (TIAC), ainsi que les analyses d'autocontrôle bactériologiques pour les industriels englobant le plan de maîtrise sanitaire (PMS) avec HACCP pour le contrôle de surfaces, de matières premières, en cours de fabrication et les produits finis, ...

## II.2 MATERIEL ET METHODES

L'incidence des Staphylocoques aureus à coagulas positive dans les denrées alimentaires est l'objectif de ce travail. Pour se faire, une étude microbiologique basée sur les méthodes de prélèvement, d'enrichissement et d'identification au test biochimique (catalase, coagulas) suivie par une confirmation par la méthode de réaction en chaîne par polymérase (PCR) pour l'identification du génome de la coagulas.

L'ensemble du matériel et méthodes utilisés pour la réalisation de ce travail son basés sur la norme ISO 6888-3:2003 qui spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement et la recherche des staphylocoques à coagulas positive, applicable pour les produits destinés à l'alimentation humaine, animale et les échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments. Cette méthode est recommandée pour les produits susceptibles de contenir des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus*), mais aussi les *Staphylococcus intermedius* et certaines souches de *Staphylococcus hyicus* qui peuvent également sécréter la coagulas libre.

### II.2.1 Matériel

- ***Le petit matériel***

Nous avons utilisé une verrerie résistante à des stérilisations répétées, il s'agit de :

- ✓ Flacons de culture ;
- ✓ Tubes de culture à couvercle métallique, de 16 mm de diamètre et 125 mm de longueur ;

- ✓ Eprouvettes graduées, pour la préparation des milieux complets ;
- ✓ Pipettes graduées, de 5ml et 1 ml de capacité, graduées respectivement en 0,5 ml ;
- ✓ Boîtes de Pétri stériles ;
- ✓ Pippeteurs automatiques dotés d'embouts en plastique ;
- ✓ Râteaux en plastique.

- ***Le gros matériel***

Le gros matériel utilisé pour la réalisation de ce travail est cité en liste ci-dessous :

- ✓ Balance ;
- ✓ Homogénéisateur type péristaltique (stomacher) ;
- ✓ Autoclave ;
- ✓ Haute microbiologique ;
- ✓ Matériel d'incubation (étuve et bain marie) ;
- ✓ Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) réglable à 173° C et en chaleur humide (autoclave) réglable à 121° C  $\pm$  1 ;
- ✓ Etuve réglable à 25° C  $\pm$  1 , à 30° C  $\pm$  1 et à 37°C  $\pm$  1 ;
- ✓ Bains d'eau réglables à 45° C  $\pm$  1 ou à 37° C  $\pm$  1 ;
- ✓ Réfrigérateur ;
- ✓ Chambre froide à température comprise entre 3°C  $\pm$  2°C pour la conservation ;
- ✓ Centrifugeuse ;
- ✓ Thermocycleur ;
- ✓ Vortex ;
- ✓ Electrophorèse ;
- ✓ Lampe UV.
- ***Les réactifs***
- ✓ Eau peptonée ;
- ✓ R.P.F. supplément ;

- ✓ Jaune d'œuf ;
- ✓ Agarose 1.5% ;
- ✓ Kit ADN invitrogene ;
- **Milieux de culture**
  - ✓ Baird parker : dont la composition est illustrée dans le tableau II.1 suivant :

Tableau II.1 : Composition du milieu de culture Baird parker

Bio-Trypcase	10g
Extrait de viande de bœuf	5g
Extrait de levure	2g
Chlorure de lithium	5g
Pyruvate de sodium	10g
Glycocolle	12g
Tellurite de potassium	1 mL
Emulsion de jaune d'œuf à 10 %	1 mL
Agar	15g
pH	7,2

- ✓ **Chapman** : caractérisé par la composition présentée dans le tableau II.2 suivant :

Tableau II.2 : Composition du milieu de culture Chapman

Peptones	11,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Chlorure de sodium	75 g
Mannitol	10,0 g
Rouge de phenol	0,025 g
Agar	15 g
Eau distillée (qsp)	1000 mL

- ✓ **Gélose nutritive** : caractérisée par la composition montrée dans le tableau II.3 suivant :

Tableau II.3 : Composition de la gélose nutritive

Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
Peptones	5g
NaCl	5g
Agar	
Eau	
pH= 7,4	

## II.2.2 Méthodes

### II.2.2.1 Analyse microbiologique

#### a) Préparation des milieux

L'élaboration des milieux s'est faite à partir des poudres lyophilisées. Au moment de l'emploi, une quantité de poudre équivalente à la quantité de milieu voulue est pesée avec précision. La poudre dissoute est chauffée et maintenue à ébullition pendant environ 2 min afin de permettre la dissolution des cristaux. Les milieux sont ensuite repartis soit dans les tubes, soit dans les flacons stériles avant d'être autoclavés à 120-121°C pendant 15 à 20 min. Les tubes sont stockés sous forme de culot. Au moment de l'emploi, ils sont fondus ensuite solidifiés pour réaliser les milieux inclinés. Quant aux flacons, ils sont fondus au bain-marie bouillant avant l'usage et repartis dans les boîtes de pétri. Ces milieux prêts à l'emploi sont conservés à 4°C dans des sacs plastiques soudés.

#### b) Echantillonnage

La qualité des prélèvements conditionne la suite de l'analyse et la valeur des résultats. Le prélèvement doit respecter les conditions strictes d'asepsie et de stérilité.

- **Produit analysé**

Les produits analysés sont des denrées alimentaires diverses y compris les plats cuisinés à base de viande et de légumes. Les échantillons sont pris au hasard à partir de différentes restaurations

collectives dans la région de Blida : résidences universitaires, restaurants universitaires, hôtels et gargotiers. Le prélèvement des plats cuisinés est réalisé à l'aide de cullères stériles et placé dans des sacs stériles transportés au laboratoire dans une glacière. Il est important de noter que les échantillons représentatifs reçus au laboratoire étaient non endommagés ou modifiés lors du transport et de l'entreposage.

**c) Prise d'essais**

Comme un pré-enrichissement de l'échantillon, 25 grammes d'aliment sont homogénéisés dans 225 ml de bouillon tryptone-sel (TSE : un milieu nutritif non inhibiteur) à l'aide d'un homogénéisateur du type Stomacher durant 1 min. Reversée dans le même flacon, cette solution est considérée comme une solution mère.

**d) Ensemencement sur milieu Baird Parker**

Ce milieu contient une base nutritive riche comprenant des accélérateurs de la croissance : le pyruvate de sodium et le glycocole II et deux inhibiteurs : le chlorure de lithium et le tellurite de potassium. Il existe trois critères de différenciation :

- une réduction du tellurite en tellure noir ;
- une protéolyse des protéines du jaune d'œuf au halo clair autour de la colonie ;
- et une hydrolyse par une lécithinase des lécithines du jaune d'œuf qui donne un liseré blanc opaque autour de la colonie ;

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, nous transférons 0,1 ml de la dilution  $10^{-1}$  (solution mère) de l'échantillon sur la surface d'une boîte de gélose Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium. Nous étalons soigneusement l'inoculum sur la surface du milieu en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (râteau).

**e) Incubation**

Les boîtes sont incubées dans l'étuve à 37 °C en aérobiose et examinées après 24 à 48h.

**f) Lecture macroscopique**

L'observation des *S. aureus* donne des colonies noires, brillantes, convexes, de 1 à 2 mm de diamètre entourés d'un halo clair. La plupart des autres espèces de staphylocoques sont inhibées ou ne produisent pas des colonies caractéristiques en 24 heures. Les microcoques, Bacillus et quelques levures peuvent pousser sur ce milieu.

**g) Test de la Coagulase**

Une partie de chaque colonie est sélectionnée, prélevée et ensemencée dans un tube de bouillon cœur – cervelle (BHIB) et incubée à 37°C pendant 24 heures.

Un plasma de lapin déshydraté est utilisé. Une réhydratation de ce milieu, conformément aux instructions du fabricant, est réalisée. Un volume pour 3 volumes d'eau stérile est utilisé. Dans des tubes stériles à hémolyse, 0,1 ml de chaque culture est ajouté aseptiquement à 0,3 ml de plasma de lapin (à moins que d'autres quantités soient spécifiées par le fabricant). Le mélange est incubé à 37 °C.

En inclinant le tube, la coagulation du plasma après 4 h à 6 h d'incubation est examinée. Si le test est négatif, nous réexaminons les échantillons après 24 h d'incubation, comme nous pouvons les examiner également après les temps d'incubation préconisés par le fabricant.

La réaction à la coagulase est considérée comme positive quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide.

À titre de contrôle négatif, nous ajoutons, pour chaque lot de plasma, 0,1 ml de bouillon cœur-cervelle stérile à la quantité recommandée de plasma de lapin (5,5) et nous incubons sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation.

**h) Teste de la Catalase**

Sur les cocci Gram + en colonies β-hémolytiques, nous effectuons la recherche de la catalase. Nous disposons une goutte d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sur une lame et on y émulsionne une colonie de bactéries. Une réaction positive se traduit par un dégagement de bulles d'oxygène.

**i) Fermentation de mannitol**

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, utilisé surtout en microbiologie médicale, permettant la croissance des germes halophiles. Parmi ces germes, figurent au premier rang les bactéries du genre *Staphylococcus*, mais aussi les *Micrococcus*, les *Enterococcus*, les *Bacillus*, et de rares bactéries à Gram négatif.

Ce milieu contient un inhibiteur qui est une forte concentration en chlorure de sodium (75 gL<sup>-1</sup>), ce qui permet un isolement sélectif de *Staphylococcus* tolérant les fortes concentrations en NaCl. La fermentation du mannitol se traduit par une acidification du milieu provoquant un virage du rouge de phénol (indicateur coloré) au jaune autour des colonies.

Les colonies mannitol+ sont entourées d'une auréole jaune. L'utilisation du mannitol est un caractère discriminatif important dans le genre *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus* étant mannitol +.

L'ensemencement se fait massivement, en stries serrées ou par inondation. Il est à noter que le milieu n'est pas séché à l'étuve avant l'ensemencement car la dessiccation du milieu pourrait entraîner une augmentation de la concentration en NaCl et rendre le milieu trop inhibiteur.

Même si le milieu de Chapman permet la sélection des *Staphylococcus* et une orientation pour l'identification de l'espèce *S. aureus*, il reste un test de présomption. La confirmation par des tests plus spécifiques (coagulase, ADNase...) reste obligatoire.

#### ***j) Coloration de gram***

- Nous réalisons un frottis sur une lame de microscope à partir d'une suspension bactérienne: nous agitons la suspension afin de l'homogénéiser et d'éviter d'avoir un culot au fond du tube. Avec l'aide d'une anse que l'on aura préalablement stérilisé (en le passant sous le bec benzène), nous prélevons un peu de la solution bactérienne en plongeant le fil de platine de l'anse dans le tube à essai.
- Nous déposons ensuite ce prélèvement au milieu de la lame en faisant des rotations jusqu'à séchage.
- Nous procédons à la fixation du frottis soit avec de l'éthanol à 90° (5 minutes) puis nous enflammons la lame ou nous passons directement 3 fois la lame dans la flamme du bec Bunsen.
- La coloration au violet de Gentiane (colorant basique): la lame est plongée pendant 2 à 3 minutes (en fonction de la concentration) dans la coloration au violet de gentiane. Toutes les bactéries sont colorées en violet puis rincer à l'eau déminéralisée
- Mordançage au lugol (solution iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. Cette étape permet de stabiliser la coloration violette.
- Décoloration à l'alcool : verser goutte à goutte l'alcool sur la lame inclinée obliquement. Surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée. L'alcool pénètre dans la bactérie. La coloration au violet de Gentiane disparaît. Les bactéries décolorées sont des bactéries Gram-. Si l'alcool ne traverse pas la paroi, nous sommes en présence de bactéries Gram+.
- Contre coloration avec de la Fuchsine ou de la Safranine: laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes. Les bactéries Gram- sont colorées en rose.

#### ***k) Purification des isolats sur gélose nutritifs***

Avec une pipette pasteur, nous prenons une colonie de souche isolées sur milieu Chapman et nous la repiquons sur gélose nutritif (institut pasteur, Algérie) incubée à 37°C pendant 24h.

**1) conservation sur milieu de conservation : (gélose inclinée)**

Par piqure central dans le milieu de tube de conservation à l'aide d'une pipette pasteur les souches sont incubées à 37°C pendant 2h puis conservées.

**II.2.2.2 Biologie moléculaire****a) Utilisation des amorces**

Pour utiliser les amorces, nous devons faire des dilutions à 100 micromolaire, donc ajouter 10 fois la concentration en nmole avec de l'eau double distillée stérile :

Gene	Amorces	Size of amplified product	Source
Coagulase	forward: ATAGAGATGCTGGTACAGG  reverse: GCTTCCGATTGTTTCGATGC	627, 710,910pb	DewanandRajaramKalorey et al 2007

Il faut bien identifier le nom de l'amorce sur le tube et la conserver à -20°C

**b) Extraction d'ADN**

L'extraction a été réalisée par le Kit INVITROGEN®, qui a été conçu pour une préparation rapide et efficace d'un ADN génomique hautement pure.

L'ADN est extrait directement des cultures jeunes de 18 à 24h. Des colonies raclées à partir des boîtes pétri à l'aide d'un écouvillon stérile sont mises dans des tubes coniques contenant 1 ml de TE buffer. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min ensuite récupérés tout en jetant le surnageant. 18 µl de genomic digestion buffer sont ajoutés et mixés au vortex une première fois pendant une minute, ensuite une deuxième fois après l'ajout de 20 µl de protéine k et 200 µl de génomique lysis buffer. Après avoir incubé à 55°C pendant une heure, 200 µl d'éthanol absolu sont ajoutés et mixés au vortex.

Les solutions obtenues sont ensuite transformées dans des colonnes à collecteur qui seront centrifugés 10000 pendant une minute à température ambiante. La protéine dénaturée, la cellule, les débris muraux et les polysaccharides sont éliminés en ajoutant en premier temps 500 µl de wash buffer 1 qui est centrifugé à 10000 pendant 1 min à température ambiante. En deuxième temps, 500 µl de wash buffer 2 sont ajoutés et centrifugés à 15000 pendant 3 min à température ambiante tout en jetant à chaque fois les collecteurs et les mettant dans de nouveaux uns.

Les colonnes sont transformées dans des tubes de 1,5 ml avec 50 µl de genomic solution buffer et centrifugées à 15000 pendant une minute à température ambiante. Une deuxième centrifugation à 15000 pendant deux minutes à température ambiante est appliquée après avoir jeté cette fois-ci les colonnes et garder les collecteurs contenant de l'ADN purifiée. Ce dernier est conservé à une température de 4°C.

### c) Préparation du mix : post-PCR

Les quantités des produits ajoutés pour obtenir un mix pour 4 souches sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau II.4 : Composition de solution mix post-PCR

Réactifs	Quantité
Pcr buffer *10	10 µL
Dntp mix10Mm	2 µL
Mgcl <sub>2</sub> 25Mm	4 µL
Forward primer 10	2 µL
Reverse primer10	2 µL
Ampli taq gold	0,5 µL
H <sub>2</sub> O	79,5 µL

Pour le gène de la coagulas, la réaction nécessite un mélange de volume finale de 25 µl composé de 23 µl du mix PCR et 2 µl d'ADN de souche à tester. L'amplification des gènes est effectuée à l'aide d'un thermocycleur (Figure II.1) selon les paramètres suivants :



Figure II.1 : Thermocycleur

Dénaturation initial : 95/10 min

Dénaturation : 94/40 sec

Annealation : 59/1 min

Extension : 72/1 min

Extension finale : 72/10 min

#### **d) Préparation de gel d'agarose**

Mélanger 3 gramme de poudre d'agarose dans 200 ml de TBE (TRIS Borate EDTA) puis faire fondre dans un micro-onde jusqu'à la fusion totale du gel , enfin ajouter 10  $\mu$ L de bromure d'étudium (prendre des précaution lors d'utilisation), ensuite couler sur la cuve après avoir Préparer le moule, le peigne appropriés au nombre et au volume des échantillons à séparer, et laisser refroidir. La figure II.2 illustre le gel d'agarose préparé.

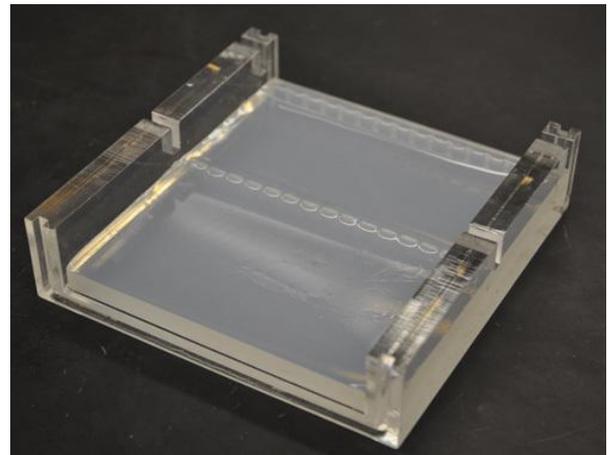


Figure II.2 : Gel d'agarose

#### **e) L'électrophorèse d'AND**

Deposer l'ADN extrait et le standare sur le gel d'agarose, après avoir ajouté le glycerole, qui vas servir à colorer, et densifier l'ADN pour se déposer au fond des puits. Placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon TBE (Figure II.3).

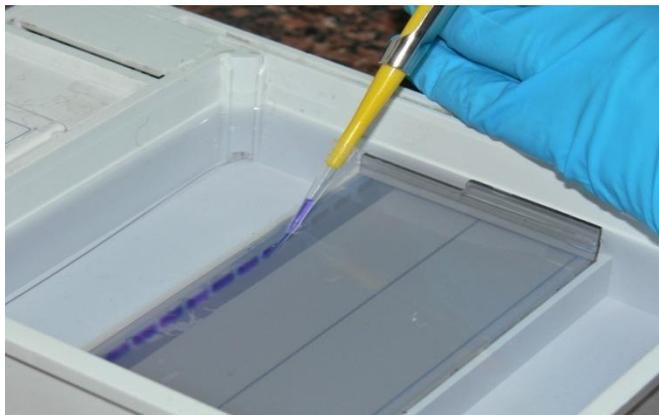


Figure II.3 : Chargement d'un gel d'agarose pour l'électrophorèse

Effectuer la migration sur gel d'agarose par électrophorèse 90 V (Figure II.4) pendant 30 min. cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique, et qui vont migrer du pôle négatif au pôle positif.

La séparation s'effectue à travers la matrice du gel d'agarose se fait en fonction du poids moléculaire et donc de la taille de l'ADN. Toutefois la conformation de l'ADN est aussi un facteur important, à savoir que les molécules de plus petites tailles se déplacent plus rapidement et migreront plus loin que les molécules de tailles supérieures.

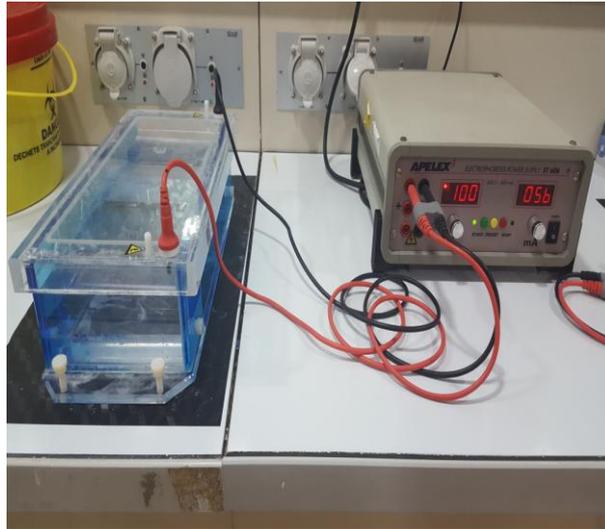


Figure II.4: Cuve électrophorèse

#### *f) Lecture des résultats*

Après la migration d'électrophorèse, le gel est éclairé sous ultraviolet (Figure II.5) afin d'observer les bandes d'ADN fluorescente. Le gel est généralement pris en photo avec un appareil photo numérique. Bien que la couleur de l'ADN fluorescent soit rouge-orangée, les photographies sont publiées en noir et blanc



Figure II.5: Lampe UV

## Chapitre III

# RESULTATS ET DISCUSSIONS

### III.1 RESULTATS EXPERIMENTAUX

#### III.1.1 Identification bactériologique

##### a) *Prélèvements*

Durant une période de quatre mois (mars 2017 - juin 2017) ; 50 prélèvements d'aliments de restauration ont été analysés au service de bactériologie des eaux et des aliments à l'institut pasteur d'Algérie. Les prélèvements sont présentés dans le tableau III.1 et sur la figure III.1 suivants :

Tableau III.1 : Type de denrées alimentaire faisant l'objet des analyses

Type de prélèvement	Nombre de prélèvement	Pourcentage
Denrée alimentaire à base de viande	16	32%
Denrée alimentaire à base de légumes	18	36%
Divers	16	32%

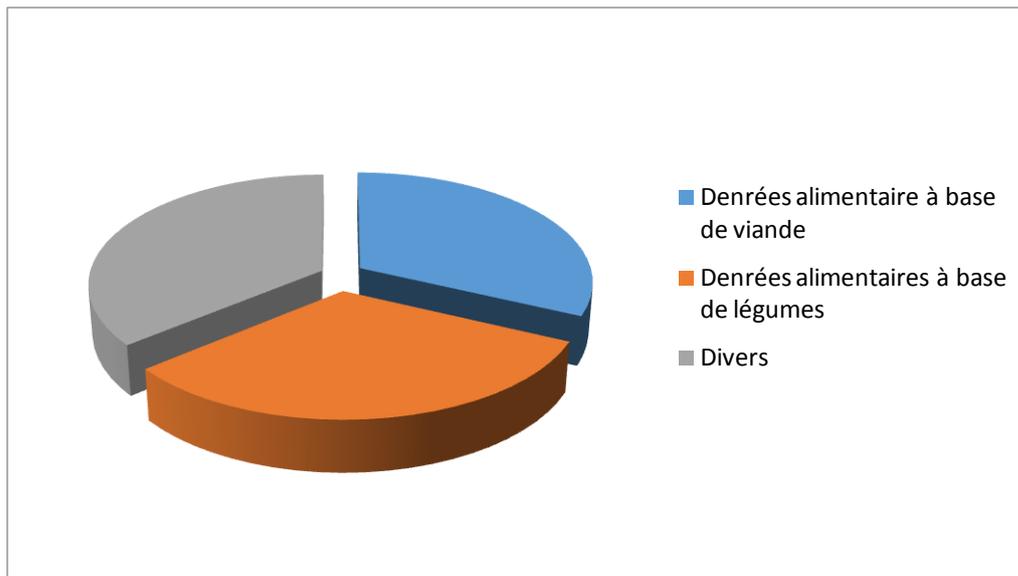


Figure III.1 : Présentation des différents prélèvements par secteur

##### b) *Isolement des souches*

Parmi les cinquante cultures, 33 ont poussé sur Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium soit un taux de 66%. Et sur ces 33 cultures, 22 sont des colonies caractéristiques qui ont poussé sur milieu Chapman soit un taux de 44% staphylococcus spp.

A partir de la figure III.2 présentant l'aspect de colonies de *S. aureus* sur milieu Baird Parker, nous remarquons que les aspects de la culture des staphylocoques réduisent le tellurite de potassium en tellure métallique en produisant des colonies noir. En outre, le jaune d'œuf contient des lipoprotéines qui peuvent être hydrolysées par des lipoprotéinases en produisant un halo

d'éclaircissement autour de la colonie. Après 48 heures d'incubation, une opacification peut apparaître dans le halo traduisant l'action d'une lécithinase.

Tableau III.2 : Souches staphylocoques à coagulas positive (SCP)

Type de prélèvement	Nombre d'échantillons	Sur Baird Parker	Sur Chapman
Denrée alimentaire à base de viande	18	14	9
Denrée alimentaire à base de légumes	16	13	9
Divers	16	6	4
Total	50	33	22

La figure III.3 montre l'aspect de colonies de *S. aureus* sur milieu Chapman. En raison de sa forte concentration en NaCl, le milieu Chapman permet la sélection des bactéries du genre *Staphylococcus* cultivant en milieu hyper salé (bactéries halophiles). La plupart des autres bactéries sont inhibées. Grâce à la présence d'un indicateur de pH qui est le rouge de phénol, la lecture d'utilisation du mannitol comme source de carbone est possible car elle acidifie le milieu, ce qui est révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune). Les bactéries qui utilisent le mannitol sont dites mannitol+.



Figure III.2 : Aspect de colonies de *S. aureus* sur Baird Parker

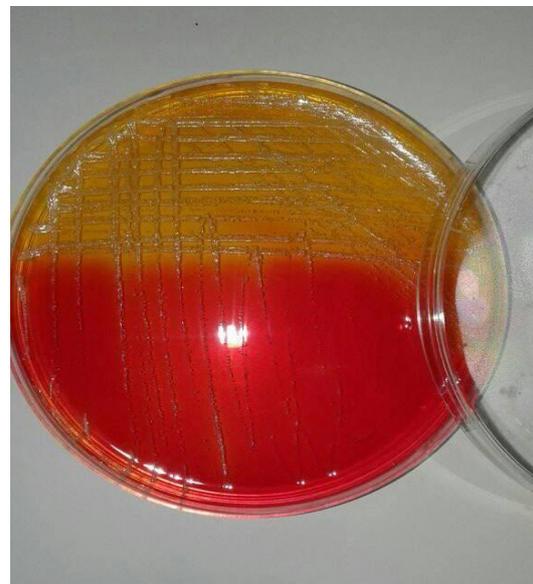


Figure III.3 : Aspect de colonies de *S. aureus* sur Chapman

- ✚ Le teste de la catalase est à la base tests de routine des aérobies et des bactéries Gram positifs tout comme les staphylocoques. Pour les réactions positives on remarque par évidence immédiate une effervescence (formation de bulles) comme illustre la Figure III.4.
- ✚ Les staphylocoques sont des cocci à gram positive, ils retiennent la coloration de gram, et apparaissent isolés en diplocoques ou en amas (Figure III.5), l'examen direct du prélèvement peut donner une orientation diagnostique importante. Cependant, le diagnostic définitif du genre et de l'espèce ne sera obtenu qu'après la culture et l'identification des souches.

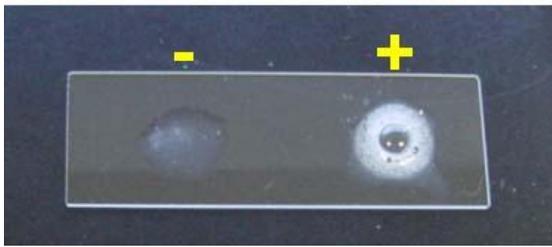


Figure III.4 : Teste de la catalase

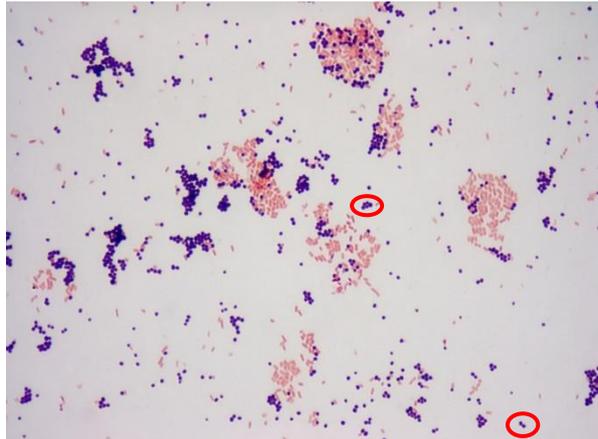


Figure III.5 : staphylocoque gram +

### c) Identification des staphylocoques coagulas positive

Une réaction de coagulas est dite positive, quand le coagulum occupe plus que la moitié du volume initialement occupé par le liquide comme illustré sur la figure III.6.

Le tableau III.3 montre le nombre des souches staphylocoques à coagulas positive (SCP) dont 14 souches sur 33 cultures ont poussé sur Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium soit une fréquence de 28%. 19 souches ont montré une coagulas négative, soit une fréquence de 38%. Le test de la coagulas à été effectué à l'aide de sérum lapin lyophilisé (au niveau de l'institut Pasteur d'Algérie).

Tableau III.3 : Nombre des souches staphylocoques à coagulas positive (SCP)

Prélèvement	culture positive	Staphylococque à coagulas positive	Staphylocoque à coagulas négative
50	33	14	19
100%	66%	28%	38%



Figure III.6: Test de coagulas

#### ***d) Répartition des staphylocoques selon les prélèvements***

Nous avons isolé 14 souches de staphylocoques à coagulas positive, soit une prévalence de 28% sur l'ensemble des prélèvements analysés. La fréquence la plus élevée a été trouvée dans les produits divers (sandwich, tranche de pizza et pièce de pâtisserie, ...) avec un pourcentage de 66,66%, suivie par les denrées alimentaires à base de viande avec 53,84%, et en dernier les denrées alimentaires à base de légumes avec 28,57%.

Tableau III.4 : Répartition des staphylocoques selon le test de coagulas

Types d'aliments	Nombre de culture positive sur Baird Parker	Nombre de staphylocoque coagulas positive	Pourcentage de staphylocoque à coagulas positive
Plats cuisinés à base de légumes	14	04	28,57%
Plats cuisinés à base de viande	13	07	53,84%
Divers	06	04	66,66%

### III.1.2 Identification moléculaire

#### a) *Électrophorèse de l'ADN extrait*

Cette technique a pour but de vérifier l'efficacité du protocole d'extraction et la qualité d'ADN obtenu. Elle révèle des bandes uniques avec absence de smear ; ce qui veut dire que l'ADN extrait est pure et n'est pas contaminé.

Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge-orangée, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN (Figure III.7).

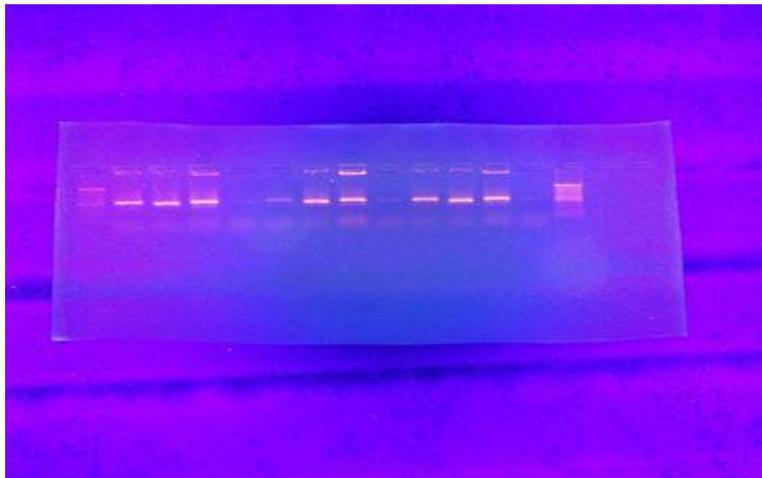


Figure III.7 : Gel d'électrophorèse sous UV

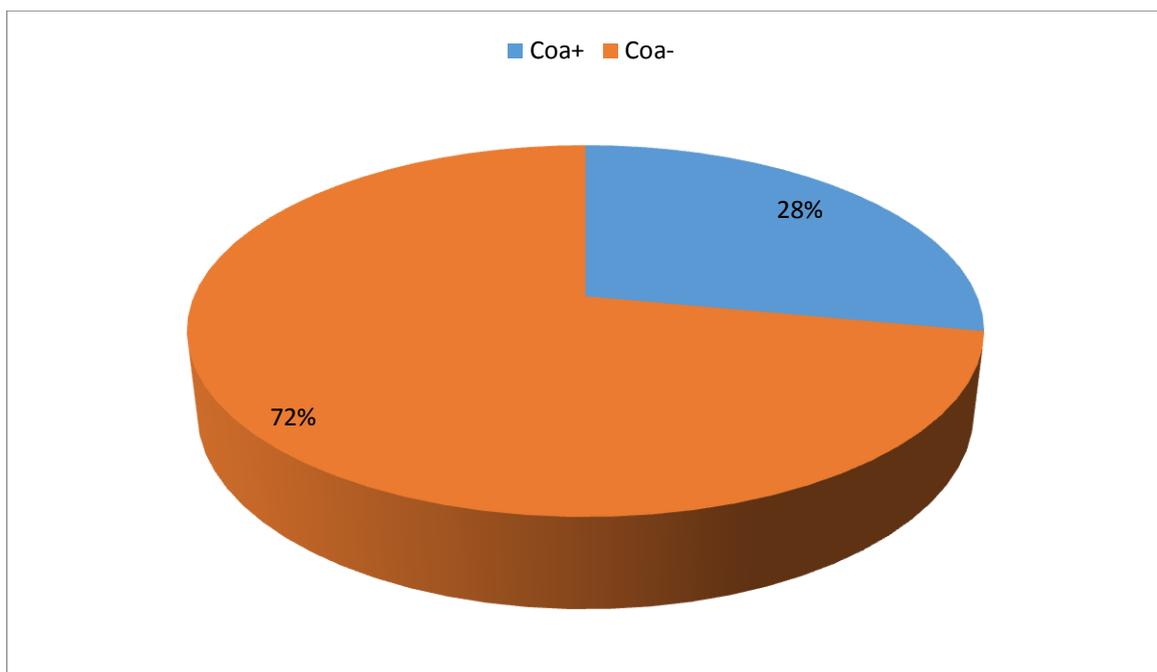


Figure III.8: graphe<sup>22</sup> expressif du gène de coagulas par PCR

L'amplification de gène de coagulas a donné un amplicant à 627 et 710 bp dans 14 souches soit une fréquence de 28% (Figure III.8), ce qui confirme le test à coagulas sur tube.

La protéine de la coagulas est le principal facteur de virulence de *staphylocoques aureus* [55]. L'amplification a été recommandée comme méthode précise pour l'identification des souches virulentes de *S. aureus* [56].

Sa caractérisation par PCR a révélé un polymorphisme de gène le même cas dans différentes études de gène de coagulas, ce qui explique la diversité génétique des souches de staphylocoque.

### III.2 DISCUSSIONS

Dans notre étude, la prévalence globale de *S. aureus* dans les 50 échantillons analysés était de 14 soit 28%. Le taux de contamination des produits divers venant des gargotiers et pâtisseries était supérieur à celui observé dans les produits à base de viandes et les produits à base de légumes.

Le taux de contamination obtenu dans notre étude est supérieur à celui de Seo et al. [57] qui ont signalé une prévalence globale des *S. aureus* de 11,3% dans les 355 échantillons analysés, quoi que le taux de contamination le plus élevé a été signalé dans les 19 échantillons de poussés avec un pourcentage de 17% et 13 échantillons de salades mélangées soit un pourcentage de 10,1%. Ce taux de contamination est également supérieure à celui obtenue par Cho et al., [58] dans une enquête en Corée sur les produits de pâtisserie. Sur 1 151 échantillons 79 ont été trouvé *S.aureus* positifs, soit un pourcentage de 6,9%.

Par contre, notre résultat est inférieur à celui obtenu par Yi Li [59] ayant déclaré une prévalence de contamination par les *S.aureus* de 34,14% dans les produits à base de viande spécialement du bœuf haché.

Tang et al. [60] ont déclaré une forte apparition de *S. aureus* dans les 121 échantillons alimentaires examinés dont 103 échantillons contaminés avec un taux de contamination de 85,1%. Un taux 100% de contamination a été retrouvé dans les produits aquatiques et les ovo produits. Dans la viande et de la viande crues produits, ils trouvé un taux de contamination de 95,5% (21/22) et 93,5% (29/31), respectivement. Pour les produits de soja, gâteaux secs, décapés légumes, légumes et fruits et produits à base de riz 86,7% (13/15), 80% (4/5), et 78,1% (25/32), 75% (3/4) et 66,7% (2/3) respectivement.

Dans une étude sur les produits alimentaires commercialisés, Normanno et al. [61] ont isolé 537 souches de *S. aureus* sur 541 Souches de CPS. Comparativement à notre étude, c'est une prévalence excessivement élevé.

En réalité, les staphylocoques sont des bactéries transmises par le personnel du fait qu'elles sont présentes sur la peau, le nez et la gorge. Leur présence dans les aliments pourrait être expliquée par une contamination introduite directement dans la nourriture suite à une mauvaise manipulation à travers des porteurs sains ou infectés. Une telle présence de ce pathogène, qui devrait être éliminé par la chaleur durant le traitement (cuisson ou pasteurisation), est synonyme de l'ignorance ou la négligence des bonnes pratiques d'hygiène par les manipulateurs des denrées alimentaires aux cours de leur production, transformation et/ou la distribution.

En effet, la présence de ce pathogène dans les aliments transformés représente un grand risque pour la santé humaine. Sa propagation par les manipulateurs d'aliments suscite des préoccupations, et doit être éliminé dans la chaîne alimentaire [62].

Les produits pâtisseries, les œufs, la crème, la mayonnaise et les salaisons sont les plus exposés puisque ce sont des aliments riches en protéines et peu acides, et la bactérie tolère bien le sel et les nitrites à la contamination [63].

Les légumes sont aussi exposés à diverses conditions pendant la croissance, la récolte, la préparation, l'emballage et la distribution qui pourraient augmenter la contamination naturelle. De tels produits souffrent de désinfection qui n'assure pas l'élimination complète des pathogènes. Elles peuvent également intervenir comme des vecteurs des micro-organismes. Ceux-ci restent à leur surface [64].

Les aliments d'origine animale constituent de véritables milieux de culture pour certains germes naturellement ou accidentellement pathogènes. Ainsi, la viande est un substrat favorable aux développements des micro-organismes protéolytiques qui entraînent des modifications néfastes sur l'odeur, la couleur, la texture et produisent des substances toxiques. Entre l'abattage de l'animal et la consommation de la viande ou des produits carnés, les étapes susceptibles d'introduire des micro-organismes contaminants sont nombreuses. La contamination peut être issue de l'animal atteint d'une maladie microbienne apparente ou inapparente, du manipulateur ou du matériel. L'outil utilisé pour l'abattage peut entraîner en profondeur les germes de la peau. Les opérations de découpe de la viande peuvent véhiculer les micro-organismes issus de l'environnement ou du personnel. La contamination peut aussi intervenir lors du transport ou du stockage, dans des conditions d'hygiène insuffisantes [65].

Lors de pique-niques, buffets ou réceptions pour lesquels des aliments sont préparés longtemps à l'avance et maintenus à la température de 15 à 45 °C pendant quelques heures, le risque de la prolifération bactérienne est élevé ce qui favorise la toxinogénèse. Cela est confirmé par notre étude qui révèle une fréquence élevée dans les denrées alimentaires transformées [66].

La présence des *S. aureus* dans les aliments crus est moins grave que sa présence dans les aliments qui ont fait l'objet d'un traitement thermique (cuisson ou pasteurisation) pour deux raisons: la première est due à la concurrence de la microflore pour les aliments crus, tandis que la deuxième raison est due à la susceptibilité de ces aliments crus d'inhiber la croissance des *S. aureus*. Cela fait *S. aureus* un pathogène indicateur d'une mauvaise hygiène avec un impact potentiel sur la santé publique [67].

# CONCLUSION GENERALE



L'objectif de notre étude est d'étudier la présence des *S. aureus* à coagulas positive comme pathogène de l'alimentation. Pour cela, plusieurs denrées alimentaires ont été analysées selon les méthodes conventionnelles à savoir l'échantillonnage, la prise d'essais, l'isolement et l'identification. Ces procédures ont été renforcées par une méthode moléculaire appelée Réaction de Polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction, PCR). La PCR nous a permis, en fait, de faciliter l'identification des souches pathogènes des *S. aureus* ainsi que l'obtention rapide des résultats ; ce qui induit à une intervention précoce.

L'ensemble des résultats obtenus ont révélé que sur 50 prélèvements d'aliments de restauration qui ont été analysés à savoir 16 denrées alimentaires à base de viande, 18 denrées alimentaires à base de légumes, et 16 produits divers, 14 souches de staphylocoques à coagulas positive ont été isolées soit une prévalence de 28%, dont les pourcentages selon la nature des produits précédemment cités sont 28,57%, 53,84% et 66,66% respectivement.

En outre, nos résultats mettent en lumière, les aliments qui peuvent être le siège de prolifération microbienne, et qui sont à la fois des produits riche en éléments nutritifs et placés dans des conditions favorables à la croissance microbienne. Cela présente un grand danger pour le consommateur surtout lors du non-respect des normes d'hygiène strictes.

Le *Staphylococcus aureus* est l'espèce la plus répandue dans la nature attaquant les denrées alimentaires sensibles à la contamination microbienne. Il s'agit d'un pathogène d'origine alimentaire à ne pas négliger. Pour cela, nous recommandons des mesures de propreté rigoureuses afin d'éviter toute contamination des aliments en vue d'assurer leur salubrité. De telles mesures consistent en:

- le respect des règles élémentaires d'hygiène veillant à la propreté de la vaisselle et des mains ;
- le respect des lois de bonnes pratiques d'hygiène à tous les stades de la chaîne alimentaire ainsi que de la matière première passant par le système de transformation (fabrication) jusqu'au produit fini ;
- le respect de la chaîne du froid pour les produits congelés ;
- la cuisson des aliments à des températures adéquates ;
- la conservation des aliments à l'écart les uns des autres pour éviter la contamination croisée et ainsi la prolifération des germes.

REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES



- [1] OMS, (2000). Salubrité des aliments et maladies d'origine alimentaire. Aide Mémoire n° 237.
- [2] FAO, (1994). Microbiologie et Hygiène Alimentaire. Numéro spécial, Actes du Séminaire FAO/AAMHA/FMS sur le thème Recherche des germes pathogènes dans les aliments. Rome, Italie.
- [3] Démarche HACCP en restauration guide pour l'analyse des dangers édition BPI.
- [4] A. Eyquem, J. Alouf and L. Montagnier, (1998). *Traité de Microbiologie clinique «Staphylocoques»* Nevine el solh. piccin nuova, Italie. 567-591.
- [5] F.J. Rosenbach (1884), *Microorganismen bieten Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen*, Wiesbaden.
- [6] S.J. Eykin, D.J. Weatherall, J.G. Ledingham (1996), «Staphylococc». *Oxford text book of medicine*. Oxford medical publications. 533-542.
- [7] F. M. Aarestrup, (2006), «Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin», A. Martins, M. L. Cunha, (2007), «Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects», *Microbiology and immunology* 51(9): 787-795.
- [8] G.M Garrity, T.G.Lilburn, J.R. Cole, S.H. Harrison, J. Euzéby and B.J. Tindall, (2007) «Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea», Part 9-the Bacteria: Phylum "Firmicutes": Class "Bacilli".
- [9] K. Becker, A.W. Friedrich and G. Lubritz (2003), «Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of *Staphylococcus aureus* isolated from blood and nasal specimens» *J Clin Microbiol.* 41: 1434-1439.
- [10] Z.Benjema, F. Mahjoubi and Y. Ben Haj H'mida, (2004), «Profil bactériologique des bactériémies et sensibilité aux antibiotiques des bactéries en cause dans la région de Sfax (1993-1998) », *Pathol Biol.* 52: 82-88.
- [11] G.M. Garrity, K.L. Johnson, J. Bell and D.B. Searles, (2002), «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology», second ed. Springer-verlag, New York.
- [12] G. Leyral et E. Vierling, (2007), «Microbiologie et toxicologie des aliments : hygiène et sécurité alimentaires», Doin Editions, 290 p.
- [13] J.P. Euzéby, (2013), *Dictionnaire de bactériologie vétérinaire*, [en ligne], URL [www.bacdico.net](http://www.bacdico.net).
- [14] M. L. De Buyser, 2008. « Entérotoxines staphylococciques dans le lait cru et les fromages au lait cru ». *Bulletin des GTV*, (43), p. 37–42.
- [15] Brisabois et Coll, (1997) , Euzéby, (2013) , Leyral et Vierling, (2007) « Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : situation en France et en Europe ». *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*,vol. 16(2), p. 452–471.
- [16] M.L. De Buyser, (2008), « Entérotoxines staphylococciques dans le lait cru et les fromages au lait cru », *Bulletin des GTV*, (43), p. 37–42.

- [17] G. De Matos , (2013), «contribution à la maîtrise du risque lié à staphylocoques aureus en filière fermière de fromage de chèvre au lait cru en corse» Université Claude-Bernard - Lyon I.
- [18] S. Dufour, D. Scholl, I. Dohoo, et J. Baillargeon, (2013), réseau canadien de recherche sur la mammité bovine.
- [19] A. Herard, L. Brasme, R. Jaussaud, J. Colin, V. Vernet-Garnier, B. Lardennois, (1998), «Place actuelle des staphylocoques à coagulase négative en urologie», Progrès en Urologie, vol 8, p. 579-585.
- [20] Fiche technique: S. Cousin, novembre (2012), revue PLoS Pathogens.
- [21] Lyn El Haddad, (2010), «caractérisation des phages de staphylococcus aureus» , thèse de maîtrise en science, département de biochimie, de microbiologie, et de bioinformatique, facultés des science, Université Laval, Québec.
- [22] A.B. Diallo, (2005), «portage nasal de staphylococcus aureus en milieu chirurgical à l'hôpital du point G», faculté de médecine, de pharmacie, et d'odonto stomatologie, université de Bamako, Mali.
- [23] W. Chaalal, (2013), « occurrence et profile d'antibiorésistance des staphylocoques aureus isolée de produits alimentaires», thèse de magistère en microbiologie fondamentale et appliquée, Universités d'Es-Senia, Oran.
- [24] ANSES « Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "Staphylococcus aureus et entérotoxines staphylococciques », [en ligne] <https://www.anses.fr/fr>
- [25] J. Buswell, C. Knight, et D.Barber, (1989), « Antibiotic persistence and tolerance in the lactating goat following intramammary therapy », Vet. Rec., vol. 125(11), p. 301–303
- [26] J. P. Flandrois, (1997), Bactériologie médicale, Presses universitaires de Lyon, 320 p.
- [27] Orlandini (1999), « Les bactéries pathogènes à l'origine d'accidents alimentaires en France : rappels généraux et méthodes de détection rapide», thèse de doctorat vétérinaire, Université Claude Bernard, Lyon.
- [28] F.D. Lowy (1998), «staphylococcus aureus infections», N Eng, J Med 339, p520-532
- [29] B. Couture (1990), «Etude et méthodes d'identification des bactéries aérobies et facultatives d'intérêt médical», Bactériologie médicale Vigot, Paris. 15-32.
- [30] A. Ferron (1984), Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine 12ème édition, CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.
- [31] R. Fasquelle (1974), Eléments de bactériologie médicale, 9ème édition, Flammarion, Paris. 27-36.
- [32] J.L. Fauchere, J.L. Avril (2002), Bactériologie générale et médicale, ellipses, Paris. 213-217.

- [33] F. Garnier, D. Chainier, T. Walsh, A. Karlsson, A. Blomström, C. Greland, M. Mounier, F. Denis, M.C. Ploy, (2006), « Surveillance des souches de *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides pendant 1 an dans un hôpital Français » *J Antimicrob Chemother.* 57: 146-149.
- [34] F. Vincenot, M. Saleh, G. Prévos, (2008), « Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus* », *Revue Francophone des Laboratoires*, Volume 2008, Issue 407, Pages 61-69.
- [35] P. Boulloc et B. Felden, (2011), « Les acides ribonucléiques régulateurs du staphylocoque doré et leurs rôles dans la virulence », Volume 27, Pages 238 – 241.
- [36] P. Loulergue, S. Tourret, (2013), « Le staphylocoque doré résistant à la méticilline d'origine communautaire », base documentaire médicale.
- [37] P. Dufour, Y. Gillet, M. Bes, G. Lina, F. Vandenesch, D. Floret, J. Etienne and H. Richet ? (2002), « Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: Emergence of a single clone that produces Panton-Valentine Leukocidin », *Clinical Infectious Disease*, 35: 819-24.
- [38] M. Labandeira-Rey, (2007), « *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia », (Translated from eng), *Science* 315(5815):1130-1133 (in eng) .
- [39] H. Aouati, (2009), « Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques », thèse de magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes, Université Mentouri Constantine.
- [40] K. Chiller, B.A. Selkin, G.J. Murakawa, (2001), « Skin microflora and bacterial infections of the skin », (Translated from eng) *Investig Dermatol Symp, Proc* 6(3):170-174 (in eng).
- [41] N. Palmqvist, T. Foster, A. Tarkowski, E. Josefsson, (2002), « Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death », (Translated from eng) *Microb Pathog* 33(5):239-249 (in eng).
- [42] S.X. Xu, J.K. McCormick, (2012), « Staphylococcal superantigens in colonization and disease. *Front Cell Infect* », *Microbiol*, 2, p. 52.
- [43] S. Gibbons, M. Oluwatuyi, G.W. Kaatz, (2003), A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. (Translated from eng) *J Antimicrob Chemother* 51(1):13-17 (in eng).
- [44] Site : Institut pasteur France juin (2016).
- [45] Centre National de Référence des Staphylocoques.
- [46] R. Daoui, F. Ben Fiala, (2014), « *Staphylococcus aureus* : Effet de la nisine et de conditionnement des aliments (cas de viande) », mémoire de licence en Microbiologie fondamentale et appliquée, Université Kasdi Merbah, Ourgla.

- [47] L. Panneereelan, (2008), « Detection of staphylococcus aureus enterotoxins and enterotoxins producing strains », thèse de doctorat en philosophies, Université de Madras, Chennai, Inde.
- [48] C.M. Bourgeois, J.F. Mescle, J. Zucca, (1996), « Microbiologie alimentaire : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments », Tome 1. Editions Tec et Docs, Paris, 672 pages.
- [49] Yi Li (2010), « Isolation and characterization of antimicrobial resistant staphylococcus aureus in retail ground meat », master of Science, University of Maryland, College Park.USA.
- [50] <http://www.guide-des-aliments.com/dietetique/Information/Micro-organismes/Toxi-infections-alimentaires/AA-Staphylocoques.html>.
- [51] D. Larzul, la PCR un procédé de réplication in vitro. Paris : Technique et Documentation Lavoisier, 1993, Collection : Génie génétique G2, Vol 1. p387.
- [52] R.G. Higuchi , H. Ochman , (1989), « Production of single-stranded DNA templates by exonuclease digestion following the polymerase chain reaction », Nucleic Acids Res. 25;17(14):5865.
- [53] R. K. Saiki, D. H. Gelfand , S. Stoffel, S. J. Scharf, , R. Higuchi, G. T. Horn, , K. B. Mullis, H. A. Erlich, (1988), « Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase », Science 239: 487491.
- [54] S. A. Bustin, (2000), « Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays », Journal of Molecular Endocrinology # 25: p169-193.
- [55] M. Hussain, D. Ahmed, M.H. Mushtaq, M. S. Khan, M. P. Reichel, T. Hussain, A. Khan and M. Nisar « Molecular characterization of coagulase genes of staphylococcus aureus isolated from mastitic river buffaloes A », The Journal of Animal & Plant Sciences, 26(2): 2016, Page: 408-414).
- [56] S. Morandi, M. Brasca, R. Lodi, L. Brusetti, C. Andrighetto, and A. Lombardi, (2010), « Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing Staphylococcus aureus isolated from dairy products », Res. Vet. Sci. 88: 427-435.)
- [57] Y.H. Seo, J.H. Jang, and K. Moon, (2010), « Occurrence and Characterization of Enterotoxigenic Staphylococcus aureus Isolated from Minimally Processed Vegetables and Sprouts » Published Online: 30 April 2010© KoSFoST and Springer, Korea
- [58] H.J. Wang, J. Lee, D.Y. Lee, and D.B. Shin, (2010), « Prevalence and Characterization of Staphylococcus aureus Pathogenic Factors Isolated from Korean Rice Cakes ».

- [59] Yi Li, (2010), « Isolation and characterization of antimicrobial resistant staphylococcus aureus in retail ground meats », Master of Science, University de Maryland, College Park.
- [60] Tang, Z. Rong, J. Chen, Y. Zhao, C. Tang, H. Yue, J. Li, Q. Wang, H. Shi,(2014), « Incidence and characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from food markets Junni », Published online: 20 March 2014 #Springer-Verlag Berlin Heidelberg and the University of Milan .
- [61] G. Normanno, A. Firinu, S. Virgilio, G. Mula, A. Dambrosio, A. Poggiu, L. Decastelli, R. Mioni, S. Scuota, G. Bolzoni, D. Giannatale, E. Salinnetti , G. La Salandra, M. Batoli, F. Zuccon, T. Pirino, S. Sias, A. Parisi, N.C. Quaglia, G.V. Celano, (2005), Coagulase-positive staphylococci and Staphylococcus aureus in food products marketed in Italy. Int. J.Food Microbiol. 98: 73-79.
- [62] Cargo B, Ferrato C, Drews S.J, Severson L.W, Tyrrell G, Louie M, (2012), « prevalence of *Staphylococcus Aureus* and methicilin-resistance S.aureus (MRSA) in food samples associated with foodborne illness in Alberta », Canada, from 2007 to 2010, Journal of food microbiology,32: 202-205.
- [63] Fiche technique DLEAA Gouvernement du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation Direction générale de l'alimentation, Juin (2010).
- [64] L. Aoued, S. Benlarabi, R. Soulaymani-Bencheikh, (2010), « Les maladies d'origine alimentaire », Toxicologie Maroc, N° 6 - 3ème trimestre.
- [65] C. M. Bourgeois, J.Y. Leveau, (1991), Techniques d'analyse et contrôle dans les industries agro-alimentaire. 2ème Ed. Lavoisier. P 454.
- [66] M. Belomaria, A. Omar, T. Ahami, Y. Aboussaleh, B. Elbouhali, Y. Cherrah, A.Soulaymani. (2007), « Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chrarda Bni Hssen », Maroc.
- [67] L. Lachab, (2013), « Projet de fin d'étude. Evaluation de la qualité hygiénique des salades prêtes à consommer dans la ville des Fès », Faculté des sciences et techniques Fès.