



MEMOIRE

En vue de l'obtention du diplôme de magister en sciences vétérinaires

Option : Hygiène et qualité des aliments d'origine animale

THÈME

Recherche des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments de restauration à Alger et caractérisation moléculaire des facteurs de virulence

Présenté par Monsieur : Mekhloufi Omar Amine

Jury :

Président :	BENALLOU Bouabdellah	<i>Pr. Univ. Ibn Khaldoun de Tiaret</i>
Encadreur :	HAMMOUDI Abdelhamid	<i>Pr. Univ. Ibn Khaldoun de Tiaret</i>
Co-encadreur :	BENSEFIA Sid Ahmed	<i>Dr. institut Pasteur d'Algérie</i>
Examineur :	BOUCIF Ahmed	<i>Pr. Univ. Ibn Khaldoun de Tiaret</i>
Examineur :	ZIANE Mohamed	<i>M.C. (A) Centre Univ. d'Ain Témouchent</i>
Membre invité :	AISSAT Saad	<i>M.C. (B) Univ. Ibn Khaldoun de Tiaret</i>

Table des matières

<i>Dédicace</i>	<i>I</i>
<i>Remerciement</i>	<i>II</i>
<i>Liste des tableaux</i>	<i>III</i>
<i>Liste des figures</i>	<i>IV</i>
<i>Liste des abréviations</i>	<i>V</i>
<i>Liste des annexes</i>	<i>VI</i>
<i>Résumé en arabe</i>	<i>VII</i>
<i>Résumé en français</i>	<i>IIX</i>
<i>Résumé en anglais</i>	<i>IX</i>

<i>Introduction</i>	<i>1</i>
----------------------------	-----------------

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Généralités sur les staphylocoques

1- Historique :	4
2- Taxonomie :	4
3- Staphylococcus aureus	8
3-1- Caractères biochimiques	10
4- Habitat	10
5- Pouvoir pathogène	11

Chapitre II: facteurs de virulence

1- Facteurs de virulences	12
1-1- Principaux facteurs de virulence de <i>S.aureus</i>	13
1-2- Les entérotoxines	14
1-2-1- Nomenclature et propriétés	16
1-3- Nucléase.....	18
1-4- La coagulase	19
1-4-1- Coagulase libre	20

1-4-2- Coagulase liée (clumping factor), (ou facteur d'affinité pour le fibrinogène).....	20
2- Régulation de la production des facteurs de virulence de <i>S. aureus</i>	21

Chapitre III : Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1- Définition :	23
2- Principe de la PCR :	23
3- Détection et analyse des produits PCR	24
3- Performances de la technique PCR.....	25

Chapitre IV : les toxi-infections alimentaires

1- Définition et généralité :	27
2- Intoxications alimentaires staphylococcique	30
3- Contamination d'origine humaine	31
4- Contamination d'origine animale	31

Partie expérimentale

I- Matériels et méthodes

1- Rappel des Objectif.....	33
2- Durée et lieu d'étude	33
3- Nature des échantillons	33
4- Matériels :	33
4-1-Matériels de prélèvement.....	33
4-2-Matériels de laboratoire	33
4-3-Les milieux de cultures.....	34
4-4-Matériel biologique.....	34
4-5-Réactifs	34
4-6-Matériels de PCR.....	34
5- Méthodes.....	36
5-1- Échantillonnage	37
5-2- Méthode de prélèvement	37

5-3- Mode opératoire.....	37
5-3-1- Prise d'essai.....	37
6- Recherche des staphylocoques à coagulase positive	38
6-1- Isolement :	38
6-1-1- Ensemencement.....	38
6-1-2- Aspect de colonie	38
6-1-3- Recherche de la catalase.....	38
6-2- Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive	39
6-3- Coloration de Gram	40
6-4- Recherche de la fermentation du mannitol	40
6-5- Purification des isolats sur gélose nutritifs	40
6-6- Conservation sur milieu de conservation.....	40
7- Méthode de PCR.....	40
7-1- Utilisation des amorces :.....	40
7-2- Extraction d'ADN.....	41
7-3- Préparation du mix :	42
7-4- Préparation de gel d'agarose de 1,5% :	43
8- Amplification des gènes.....	43
8-1- Gène de coagulase	43
8-2- Gène de thermonucléase :.....	44
8-3- Gene de l'entérotoxine A.....	44
II Résultats et discussion	45
<i>Conclusion et perspective</i>	60
<i>Références bibliographiques</i>	
<i>Annexes</i>	

Dédicace

Je dédie ce travail à :

Mes très chers parents pour leur soutien, leur amour, et leur encouragement.

Mes chers frères et sœurs.

Toute ma famille.

Et à tous mes amis.

Remerciements

Merci à dieu le tout puissant qui m'a doté de volonté et de patience pour ce travail

Mon travail s'est déroulé au laboratoire d'analyse bactériologique des eaux et des aliments de l'institut pasteur d'Algérie

Je remercie tout d'abord mon encadreur professeur Hammoudi Abdelhamid pour son encadrement, son encouragement et ses conseils

Je tien sincèrement et chaleureusement a remercié mon Co-encadreur docteur Bensefia Sid Ahmed de m'avoir bien aidé, consacré son temps et son savoir pour réaliser ce travail

Je tien également a remercié :

Mr Benallou Bouabdellah professeur à l'institut des sciences vétérinaire de Tiaret pour avoir accepté de présider le jury.

Mr Boucif Ahmed professeur à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mr Ziane Mohammed maitre de conférences (A) au centre universitaire d'Ain Temouchent pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Mr Aissat Saad maitre de conférences (B) à l'institut des sciences vétérinaires de Tiaret d'être membre invité dans le jury.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au docteur Mouffok Fouzia chef de service de bactériologie des eaux et des aliments à l'institut pasteur d'Algérie, de m'avoir accueillie dans son établissement, et mis à ma disposition tout le matériel nécessaire pour la recherche.

Mes profonds remerciements s'adressent à tout le personnel de laboratoire de bactériologie des eaux et des aliments à l'institut pasteur d'Algérie en particulier : Oudina Hadjer, Zgaie Idriss et Ayad Nassim. Pour leurs collaborations, leurs conseils et leurs encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mlle Bounab Kamir pour sa disponibilité et son aide dans la rédaction de ce mémoire.

Un grand merci à mes parents ma famille et tous mes amis.

Liste des tableaux

Tableau 1: Principaux caractères des staphylocoques.....	7
Tableau 2:Espèces à coagulase positives CPS du genre staphylococcus.	8
Tableau 3:: Caractéristiques phénotypiques de S.aureus.	10
Tableau 4: Principaux facteurs de virulence de S.aureus.	14
Tableau 5 :Résistance des entérotoxines au traitement thermique.....	16
Tableau 6: Conditions de croissance de S.aureus et de production d'entérotoxines.....	18
Tableau 7: Comparaison entre différentes méthodes de détection de S.aureus..	26
Tableau 8: Bactéries responsables de cas de TIAC et pathologies associé.....	29
Tableau9 : Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques.....	32
Tableau 10:les amorces utilisées	41
Tableau 11:les solutions utilisées	42
Tableau 12 :Mix pour 4 souches	43
Tableau 13:nombre et pourcentage des prélèvements.....	45
Tableau14: prévalence des staphylocoques à coagulase positive et négative.	47
Tableau 15:prévalence des aliments conforme et non conforme à la législation algérienne .	49
Tableau 16:Prévalence des staphylocoques à coagulase positive selon les prélèvements.	49
Tableau 17: prévalence des staphylococcus aureus.	55
Tableau 18:prévalence de staphylococcus aureus par type d'aliments.	56

Liste des figures

Figure01:morphologie cellulaire de staphylococcus aureus observée en microscopie électronique à balayage.	8
Figure 02:Facteurs de virulences de S.aureus.	12
Figure03 :Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l’expression conséquente d’agr.	22
Figure 04:principe de la réaction PCR.	24
Figure 05:protocole expérimentale.....	36
Figure 06: une amorce.....	41
Figure 07: pourcentage des types d’aliments prélevé	45
Figure 08: Aspect des colonies caractéristiques de staphylocoque à coagulase positive sur milieu Baird Parker.	46
Figure 09: Aspect des colonies de staphylocoque à coagulase positive sur milieu Chapman.	47
Figure 10:mise en évidence de la coagulase	48
Figure 11:mise en évidence de la catalase	48
Figure 12:aspect microscopique des staphylocoques a coagulase positive.....	48
Figure 13:Electrophorèse d’ADN extrait	51
Figure 14: résultat d’amplification de gène de coagulase	51
Figure 15:pourcentage du gène de la coagulase.....	52
Figure 16:résultats d’amplification de gène de nucléase	53
Figure 17pourcentage du gène de la nucléase.....	54
Figure 18:resultat d’amplification de gene d’enterotoxine A	57
Figure 19:pourcentage de gène d’enterotoxine A	58

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATCC: American type culture collection

BET: bromure d'ethidium

BHIB: brain heart infusion bouillon

COA: coagulase

dNTP: désoxyribonucléotides triphosphate

EDTA: ethylene diamine tetraacetic acid

ES: enterotoxine staphylococcique

GC : guanine cytosine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

ISO : organisation international de normalisation

mM: millimole

MSPRH : ministrere de la santé de la population et de la reforme hospitalière

ng: nanogramme

Nuc: nuclease

NaCl : Chlorure de sodium

Bp : paire de base

PCR : polymerase chain reaction

RT-PCR : Reverse transcription ou transcription inverse

SEA: enterotoxine staphylococcique A

SEI : staphylococcal enterotoxin-like

S. aureus : staphylococcus aureus

SCN : staphylocoque à coagulase négative

SCP : staphylocoque à coagulase positive

Taq: Thermus aquaticus

TIAC : toxi-infection alimentaire collective

TIA : toxi-infection alimentaire

Ufc : unité formant colonie

μl : Microlitre

μM : Micro molaire (micromole par litre)

mM : Millimolaire (millimole par litre)

UV : Ultraviolette

V : Volte

C° : Degré Celsius.

ml : millilitre

Liste des annexes

Annexes 01 : composition des milieux de culture

Annexe 02 : critères microbiologique des aliments celons l'arrêté interministériel N° 35-1998 du 24 janvier 1998.

Annexe 03 : Photo de quelques matériels utilisés

Annexe 04 : résultats de dénombrement sur milieu Baird Parker et de PCR pour tous les échantillons analysés.

الكبيرة من عوامل الضراوة التي تميز المكورات العنقودية خاصة الذهبية منها الموجودة في الاطعمة حالات كثيرة من التسممات الغذائية الجماعية و التي تشكل خطرا على الصحة العمومية. تهدف هذه الدراسة الى تقدير انزيم تخثر ايجابي و البحث عن عوامل الضراوة فيها. بين نوفمبر 2016 2017. عينة تم تحليلها بمعهد باستور بالجزائر . 38 (29.23) . بالمكورات العنقودية ايجابية ثر، مع انتشار عالي في الحلويات (93.33%)، أطباق اللحوم المطبوخة (25.71) . (33.33) (17,57). توصيف الجزيئات PCR لجينات الضراوة عن تعدد الأشكال الجيني ل coa (81) في 627 bp 710 nuc .(91) . - bp270 - (34,61%) من المكورات العنقودية الذهبية، SEA (29) في bp216 (78,57) الحلويات وكريم الحلويات .

وجود المكورات العنقودية ايجابية التخثر خاصة الذهبية في الغذاء هو خطر كبير على المستهلكين، وخاصة السلالات المنتجة للسموم المعوية. يتطلب ذلك تفعيل جماعية عن طريق الأغذية

الكلمات المفتاحية: المكورات العنقودية ، أكل المطاعم، عوامل الضراوة، توصيف الجزيئات

Résumé

Doté d'un grand arsenal de facteurs de virulence, les staphylocoques à coagulase positive particulièrement *S.aureus* sont fortement isolés et impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives ce qui constitue un problème majeur de santé publique. La présente étude avait pour objectifs d'évaluer le taux des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments de restauration dans la région d'Alger, la qualité bactériologique de ces aliments et de caractériser les facteurs de virulence par PCR. Entre novembre 2016 et juin 2017, 130 échantillons ont été analysés à l'institut Pasteur d'Algérie, 38 (29,23%) étaient contaminés par les staphylocoques à coagulase positive, avec une prévalence élevée dans les pâtisseries (93,33%), les plats cuisinés à base de viande (25,71%), les divers (33,33%), les plats cuisinés à base de légumes (17,57%). La caractérisation moléculaire par PCR des gènes de virulence a révélé un polymorphisme de gène de coagulase avec des amplicons à 627 et 710 bp, (81%), le gène nucléase (91%) avec un amplicon à 270bp avec (34,61%) de *s.aureus*, le gène *SEA* à (29%) avec un amplicon à 216bp, et 78,57% dans les pâtisseries et crème pâtissière.

La mise en œuvre d'un système d'hygiène et de surveillance est nécessaire pour caractériser ces souches et éviter des épisodes de toxi-infection alimentaire collective.

Mots clés: Staphylocoques à coagulase positive, Aliments de restauration, Facteur de virulence, PCR.

Abstract

Equipped with a large arsenal of virulence factor the staphylococci positive coagulase particularly *S.aureus* are isolated from ready to eat food and very implicated in food born poisoning constitute a major problems of public health. The aim of this study was to evaluated the rate of staphylococci positive coagulase in ready to eat food in Algiers, the bacteriological quality of these foods and characterized the factors of virulence *coa*, *nuc* and *sea* with PCR. Between November 2016 and June 2017, 130 samples was analyzed in pastor institute of Algeria, 38 (29,23%) stays contaminated by the staphylococci positive coagulase with a prevalence raised in pastry making (93,33%), the meat dishes cooked (25,71%), the various (33,33%), dishes cooked vegetable base (17,57%). The molecular characterization by PCR of genes of virulence revealed a gene polymorphism of coagulase with amplican has 627 and 710 bp, (81%), the gene nuclease (91%) with an amplican has 270bp with (34,61%) of *S.aureus*, the gene *SEA* (29%) with a amplican has 216bp, with (78,57%) in pastry making and confectioner's custard.

The implementation of a system of hygiene and monitoring for characterized these stocks and avoided the episodes of collective food born poisoning.

Key words: Staphylococci positive coagulase, Food, virulence factor, PCR.

Introduction

Introduction

Dans le monde entier, des millions de personnes souffrent des maladies transmissibles causées par des aliments contaminés. Ces maladies prennent un péage lourd dans la vie humaine, et la douleur en particulier parmi les nourrissons, les enfants, les personnes âgées. Ils créent également une énorme charge sociale culturelle et économique sur les communautés et leurs systèmes de santé (**Van dervanter, 1999**). Les maladies d'origine alimentaire sont un problème global de santé publique avec une grande implication sur la santé et l'économie. Elles provoquent une large variété de symptômes et même des mortalités, la survie des spores, la germination, la prolifération et la production de toxine dans les aliments sont responsables de ces infractions (**Senait G et al., 2016**).

Etant commode et abordable, les aliments prêts à manger sont très populaires dans le monde particulièrement en été et automne, cependant sans mesure d'hygiène pendant la préparation, la vente et la consommation, ces aliments peuvent être facilement contaminés avec des microorganismes tels que *E.coli*, *Salmonella*, *Listeria* et *Staphylococcus aureus* (**Kotzekidou., 2013**).

On trouve beaucoup d'organismes qui provoquent des toxi-infections alimentaires comme : les espèces de *Salmonella spp*, *Listeria monocytogene*, *Clostridium perfringens*, et *Staphylococcus aureus* (**Senait G et al., 2016**).

Staphylococcus aureus, sont des bactéries importantes qui causent des infections dans un large éventail de conditions chez les humains et les animaux, des infections cutanées légères à la bactériémie mortelle, des pertes économiques à la fois en termes de santé animale et humaine (**Leonard Markey, 2008; Williams et al., 2013**) En outre, l'intoxication alimentaire provoquée par les entérotoxines staphylococciques (SE) est devenue une préoccupation de rigueur (**Le Loir et al., 2003**).

L'intoxication alimentaire staphylococcique est considérée comme l'une des principales causes de toutes les maladies d'origine alimentaire (**E. Shin et al., 2016**). Au cours des dernières décennies, elle a été signalée comme la troisième cause d'infections d'origine alimentaire dans le monde (**E. Shin et al., 2016**). Le lait, les produits laitiers, les viandes, et les aliments traditionnels, jouent un rôle important

dans les toxi infections alimentaires staphylococciques, à partir de les quelle les souches de *S. aureus* ont été isolées fréquemment (**H. Hasman, 2010 ; U. Tsegmed, 2007**).

L'intoxication alimentaire staphylococcique est due à l'absorption d'entérotoxines staphylococciques secrété dans les aliments (**Le Loir et al., 2003**).Les recherches pendant les dernières décennies ont prouvé que beaucoup de manifestations d'intoxications alimentaires étaient causées par des staphylocoques.(**Zhang, Ket al., 2004**).

La source de la bactérie est fréquemment les manipulateurs d'aliments, les transporteurs asymptomatiques et le manque d'hygiène (**Alarcón, B et al., 2006**).

S.aureus produit plus de 30 types différents de facteurs de virulence, qui contribue dans leurs différentes manières pour causer l'infection (**OTE et al., 2011**).Elle peut produire les différents types d'exotoxines comme les exfoliatives toxinesA , l'exfoliative toxine B, la toxine de syndrome de choc toxique (TSST-1) , pantonvalentine leukecidine (PVL) et les entérotoxines staphylococciques (**Francis et al., 2005**).

Certaines méthodes d'identification moléculaire telles que l'amplification par chaine de réaction (PCR) sont utilisées dans ces dernières décennies pour leurs avantages de sensibilité et spécificité élevées. la PCR est utilisée pour l'identification rapide de divers agents pathogènes (**Jonas et al., 2002**), Elle est aussi utilisée pour la détection des gènes spécifiques des agents causatifs dans les laboratoires de microbiologie (**Koskinem et al., 2009**).

Parmi les facteurs de virulence des *staphylococcus aureus*, les plus importants sont : la coagulase : le produit du gène de coagulase (*coa*) est exprimé dans toutes les souches de *S.aureus*, et il est un critère de base pour l'identification des isolats de *S.aureus* (**Tang et al., 2000**). Le gène *nucléase* est connu comme spécifique pour *S.aureus*, l'amplification de ce gène est utilisé pour la détection de *S.aureus* (**Studeret al., 2008**).

Un autre concept de pathogénicité lié à *S.aureus* est la capacité de quelque souches à produire des entérotoxines (SEs) qui sont la principale source d'intoxication alimentaire, cela se produit après consommation de différentes

aliments contaminés particulièrement les aliments prêts à manger à base de viandes. (M.Á Argudín et al., 2010) Les entérotoxines staphylococcique A et D sont les plus associées aux toxi-infections alimentaires.

En Algérie les intoxications alimentaires continuent d'être un important problème de santé publique et cette situation épidémiologique a pris des proportions alarmantes, il convient de signaler que le nombre de personnes intoxiquées durant l'année 2016 est de 6019 cas avec 04 décès. (Ministère du commerce, 2017) Pour cela les objectifs de cette étude sont comme suite :

-) Détermination de la prévalence des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments de restaurations dans la région d'Alger
-) Evaluation de la qualité bactériologique de ces aliments par rapport aux staphylocoques à coagulase positive
-) Caractérisation par PCR des gènes de virulence coagulase nucléase et entérotoxine A
-) Identification des staphylococcus aureus avec la méthode PCR

La première partie de ce manuscrit s'articulera autour d'une étude bibliographique abordant des rappels sur les staphylocoques, leurs facteurs de virulence, la méthode PCR et les intoxications alimentaires, la deuxième partie s'intéressera à une étude expérimentale réalisée à l'Institut Pasteur d'Algérie qui consiste à la recherche et le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive ensuite à la caractérisation moléculaire des facteurs de virulence coagulase, nucléase et entérotoxine A.

Synthèse
bibliographique

Chapitre I

Généralités sur les staphylocoques

1- Historique

Les premières descriptions des staphylocoques (bactéries en forme de coques) remontent en 1871 lesquelles furent isolés à partir de pus d'abcès, en 1878 le bactériologiste allemand Robert Koch et le biologiste français Louis Pasteur en 1880 décrivent des grappes de coques dans du pus d'origine humaine. (Avril et al., 1992 ; Fasquelle, 1974 ; Karthik 2007).

Trois ans plus tard, en 1883 en Ecosse, le chirurgien Alexander Ogston introduit la dénomination « staphylocoque » pour décrire ces grains (*kokkos*) regroupaient en amas irréguliers polyédriques, évoquant l'aspect caractéristique de grappe de raisin. (Spicer 2003, Stephen et Hawkey, 2006) ce qui a permis par la suite de différencier *Staphylococcus* de *Streptococcus*.

En 1884, en Allemagne, Anton Julius Friedrich Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon lui les colonies étaient blanches ou dorées, autrement dit en *S.aureus* et *S.albus* (Avril et al., 1992).

2- Taxonomie

De point de vu taxonomique, le genre *Staphylococcus* appartient au phylum des Firmicutes (Légende I) constitué de quatre classes : *Clostridia*, *Mollicutes*, *Bacilli*, *Togobacteria*.

La classe des Bacilli est constitué de deux ordres : *Bacillales* et *Lactobacillales*, dont chacun est divisé en quatre familles ; *Staphylococcaceae* constitue la 4^{ème} famille des *Bacillales*, celle-ci comprend un seul genre : *Staphylococcus* avec un GC% allant de 30 à 39%. Le genre *Staphylococcus* est proche des genres *Listeria* et *Bacillus* et occupe une place très importante en pathologie humaine et animale. (Alomar, 2007 ; Garrity et al., 2007).

Phylum XIII : Firmicutes**Classe I : Clostridia****Classe II : Mollicutes****Classe III : Bacilli****Ordre I : Bacillales**Famille I : *Bacillaceae*Genre : *Bacillus*Famille II : *Planococcaceae*Genre : *Planococcus*Famille III : *Listeriaceae*Genre : *Listeria*Famille IV : *Staphylococcaceae*Genre : *Staphylococcus***Ordre II : Lactobacillales**Famille I : *Lactobacillaceae*Genre : *Lactobacillus*Genre : *Pediococcus*Famille II : *Enterococcaceae*Genre : *Enterococcus*Famille III : *Leuconostocaceae*Genre : *Leuconostoc*Famille IV : *Streptococcaceae*Genre : *Streptococcus*Genre : *Lactococcus***Classe IV : *Togobacteria***

Légende I : La classification hiérarchique du Phylum XIII (Firmicutes) basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADN/ ARN 16S (**Garrity G et al., 2007**).

Plus de 50 espèces et sous-espèces ont été décrites au début des 21 siècle, on distingue plus de quarante espèces de staphylococcus dont 24 sous espèces, un certain nombre d'entre elles sont retrouvées chez l'homme on en dénombre dix-sept (**Garrity et al., 2002**), d'autres sont présentes chez les animaux ou dans les aliments (viandes, produits laitiers,) (**Avril et al., 1992 ; Quinn et al., 2011**).

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 (Avril et al., 2003).

Au niveau des caractères phénotypiques, les staphylocoques sont des bactéries à Gram positif, à catalase positive, non mobiles, asporulés, habituellement non capsulés et halotolérants (tableau 01). La plupart des espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. saccharolyticus* et *S. aureus* subsp. *anaerobius* qui sont anaérobies strictes. (Schleifer et al., 1986)

Le caractère aéro-anaérobie facultatif, la production de catalase, l'absence d'oxydase, l'acidification du glycérol en anaérobiose et la résistance au lysozyme et à la bacitracine sont des tests simples, suffisant pour distinguer le genre *Staphylococcus* des autres cocci Gram positif (*Micrococcus*, *Macrococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Kocuria*, *Kytococcus*, *Dermacoccus*, *Arthrobacter*, *Planococcus*, *Stomatococcus*) (Brun et bes, 2000).

Néanmoins, le nombre d'espèces n'a cessé d'augmenter au cours des 20 dernières années et le genre a été remanié. (Corbière Morot-Bizot, 2006).

Morphologie	Cocci sphérique de 0,5 à 1µm de diamètre : - en amas (grappes de raisin) : <i>S.aureus</i> - en paires, amas irrégulières : autre espèces
Coloration de gram	Gram +
Mobilité	Immobilés (mouvements browniens)
Type respiratoire	Anaérobies facultatifs en général
Oxydase	-
Catalase	+
Conditions de culture	Température optimale à 37 °C ; croissance à 10 °C et à 45 °C selon les espèces PH optimal de 7,2 à 7,4
Milieux de culture	Gélose nutritive, gélose trypticase soja

Milieux sélectifs	Gélose de Baird-Parker Gélose Baird-Parker RPF Milieu de Chapman
Milieux d'enrichissement	Bouillon de Giolitti-Cantoni
Identification biochimique	API Staph bioMérieux SA ID 32 Staph bioMérieux SA

Tableau01 : Principaux caractères des staphylocoques (**Schleifer et al., 1986** et **Brun et Bes, 2000**)

Le genre *Staphylococcus* est séparé en deux groupes sur la base de la présence de la coagulase (**Alomar, 2007**).

Le critère de base de la classification des espèces de staphylocoques reste la production de coagulase libre, enzyme responsable de la coagulation des sérums humain et de lapins. On distingue ainsi sept espèces et sous-espèces à coagulase positive dont *S. aureus* (SCP) et quarante à coagulase négative (SCN) (Tableau 3) (**Bascomb et Manafi, 1998**).

Le groupe des *Staphylococcus* à coagulase négative avec 33 espèces dont la majorité ne présente pas de risque sanitaire telles que *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* isolées de lait ou fromage (**Morea et al., 1999 ; Blaiotti et al., 2004**).

Le groupe des *staphylococcus* à coagulase positive est constitué de 7 espèces identifiées : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus schleiferi*.

Espèces	Source principales	Références
<i>S. aureus</i> spp. <i>Aureus</i>	Animaux, humains	Rosenbach (1884)
<i>S. aureus</i> spp. <i>Anaerobius</i>	Ovins	De la Fuente et al. (1985)
<i>S. intermedius</i>	Chien, cheval, pigeon et vison	Hajek (1976)
<i>S. pseudintermedius</i>	Chien, chat	Devriese et al. (2005)
<i>S. delphini</i>	Dauphin	Varaldo et al. (1988)

<i>S. schleiferi</i> ssp. <i>Coagulans</i>	Chien	Igimi et al. (1990)
<i>S. lutrae</i>	Loutre	Foster et al. (1997)

Tableau 02 : Espèces à coagulase positives CPS du genre staphylococcus.

3- *Staphylococcus aureus*

S. aureus représente l'espèce par excellence la plus incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) elle appartient au groupe des staphylocoques à coagulase positive, son apparence et sous forme de cocci Gram positif de 0,5 à 1µm de diamètre, souvent regroupée par quatre ou en petits (donnant forme aux grappes de raisin). Sa classification selon le Bergy's Manuel est comme suite :

Domaine *bacteria*

Phylum *firmicute*

Classe *bacilli*

Ordre *bacillales*

Famille *Staphylococcaceae*

Genre *Staphylococcus*

Espèce *aureus* (John Wiley et al., 2009)

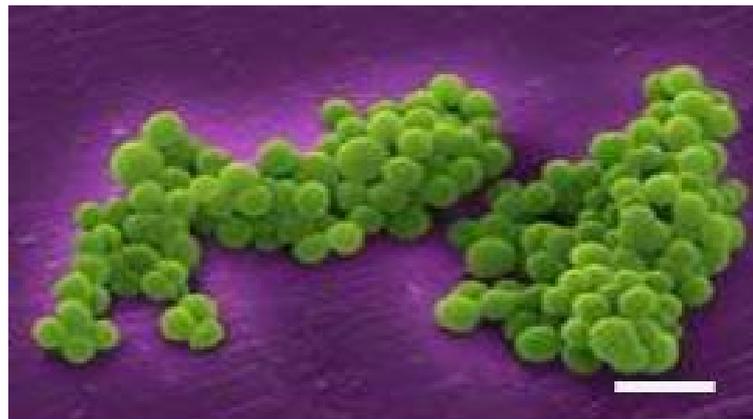


Figure 1: morphologie cellulaire de staphylococcus aureus observée en microscopie électronique à balayage. (Grosjean et al., 2011)

C'est une bactérie immobile, non sporulée et habituellement non capsulée, thermosensible, qui requière des températures de croissance comprises entre 6 Et 46°C (avec Optimum à 37°C), neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés et qui tolère pour sa croissance une concentration en sels (NaCl) élevés (jusqu'à 20%) et une activité de l'eau a_w réduite (0,83). Aéro-anaérobie facultative, cultivable facilement sur les milieux ordinaires ce qui revient à dire que *S.aureus* est non exigeante, peut également être cultivé en milieu sélectif qui est le milieu Chapman. Les colonies observées après 24 heures

d'incubation sont lisses, opaques, convexes et présentent un bord net; la pigmentation jaune à jaune-orangée n'est pas toujours apparente. Sur gélose au sang, les colonies sont souvent beta-hémolytiques. Dans le domaine alimentaire, l'identification de *S. aureus* sur gélose Baird-Parker enrichie au jaune d'œuf et au tellurite de potassium permet la révélation d'une part de la lécithinase par la présence d'un halo d'éclaircissement du jaune d'œuf et d'autre part la réduction du tellurite en tellure (colonies noires). De rares souches capsulées produisent des colonies d'aspect luisant pouvant devenir coulantes après plusieurs jours de conservation sur milieu gélosé. Globalement, l'espèce *S. aureus* peut être différenciée des autres staphylocoques par la présence de la coagulase, DNase, catalase et par la fermentation du mannitol (Avril et al., 1992).

S.aureus étant une bactérie exigeante en acides aminés et en vitamines, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est lié à la sécrétion de protéines douées de propriétés neurotoxiques chez l'Homme et qu'on appelle entérotoxines staphylococciques (Hennekinne J E, 2009).

3-1- Caractères biochimiques :

La coagulase est principalement utilisée comme un test biochimique pour l'identification de *S. aureus* (Vandenesch et al., 1994; Malathi et al., 2009, Akineden et al., 2011).

L'enzyme de coagulase qui coagule le plasma est produit par *S.aureus* dans deux types. La coagulase libre est l'enzyme sécrétée hors de la cellule et détectée par le test de la coagulase tubulaire. La coagulase liée est la protéine associée aux cellules déterminée par le test de la coagulase coulissante. Les caractéristiques phénotypiques typiques de *S. aureus* sont données dans le tableau 03) (Brun et Bes, 2000) de plus les souches de *S.aureus* contrairement aux autres espèces produisent de l'hémolyse bêta, caractéristique utile lorsqu'on cherche à identifier un staphylocoque (Couture, 1990).

Caractéristiques biochimiques	<i>S. aureus</i>
Catalase	+
Coagulase	+
Thermonucléase	+
Oxydase	-
Indole	-
Acétone	+
Urease	+
Sensibilité a la Lysostaphine	+
Utilisation de glucose en anaérobie	+
Utilisation du mannitol en anaérobie	+

Tableau 03 : Caractéristiques phénotypique de *S.aureus*. (Brun et Bes, 2000)

4- Habitat

S.aureus est une bactérie ubiquitaire présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhino-pharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, volailles) et en particulier chez l'Homme. Également été isolé de l'environnement naturel (sol, eau douce et eau de mer, poussière, air), de l'environnement domestique de l'Homme (cuisine, réfrigérateur), de l'environnement hospitalier et des ateliers de préparation alimentaires et à partir de denrées alimentaires. Il est couramment détecté dans les aliments d'origine animale tels que la viande crue et le lait en vrac brut; cependant, c'est un concurrent défavorisé et provoque rarement des intoxications alimentaires dans les produits bruts (une exception étant le lait d'une vache mammiteuse). Environ 50% des humains sont des porteurs de cet organisme et les manipulateurs d'aliments sont fréquemment impliqués dans la transmission de ce pathogène à la nourriture. En outre, l'organisme survit bien dans l'environnement des usines alimentaires où il peut faire partie de la flore de l'équipement de traitement et agir comme source de contamination ou de recontamination (Hennekinne et al., 2012).

La peau et les muqueuses de l'Homme et des animaux constituant l'habitat primaire de *S. aureus*, la présence de ce germe dans l'environnement est vraisemblablement due à une contamination par l'Homme ou les animaux (Bergdoll, 1979).

5- Pouvoir pathogène

Les infections à *S.aureus* sont très polymorphes allant d'infections cutanées bénignes comme les furoncles et les panaris à des infections mettant en jeu le pronostic vital comme les états de choc, les endocardites, les pneumonies, les infections du système nerveux central. **(Corne, 2004)**

On peut classer les infections à staphylocoques dorés en deux groupes :

- les infections suppuratives qui dépendent de la prolifération du germe, le staphylocoque est présent dans le site infectieux et le patient guérit de l'infection après élimination de la bactérie.

- les infections dites toxiques où une toxine sécrétée par le staphylocoque est responsable des symptômes. **(Corne, 2004)**

Chapitre II

Facteurs de virulence

1- Facteurs de virulences

S.aureus est doté d'un large éventail de facteurs de virulences, dont des facteurs structuraux sont secrétés. La plupart des constituants de la paroi sont impliqués dans cette virulence. En plus des protéines de surface, la bactérie sécrète un panel de toxines et d'enzymes possédant chacune des caractéristiques bien définies, sans que leur rôle respectifs ne soit encore bien compris (figure 02). L'ensemble de ces protéines liées ou diffusibles contribue à la capacité de la bactérie à surmonter les défenses de l'hôte et à envahir, coloniser et survivre dans les tissus. La synthèse de ces protéines est dépendante de la phase de croissance et est contrôlée par des gènes régulateurs, leur expression est donc étroitement régulée dans le temps. (Accarias S, 2014).

L'une des caractéristiques remarquables dans sa virulence est qu'un seul facteur de virulence peut avoir plusieurs fonctions et que plusieurs facteurs peuvent effectuer la même fonction (Archer, 1998 ; Gordon et Lowy, 2008). Les principaux facteurs de virulence et leur rôle respectif sont résumés dans le tableau qui suit (Tableau 05) (Dissemond J, 2009).

Ainsi pour dire que c'est l'action combinée de l'ensemble de ces facteurs qui explique le pouvoir pathogène de cette bactérie et la multitude de maladies humaines qu'elle provoque (Hiron, 2007).

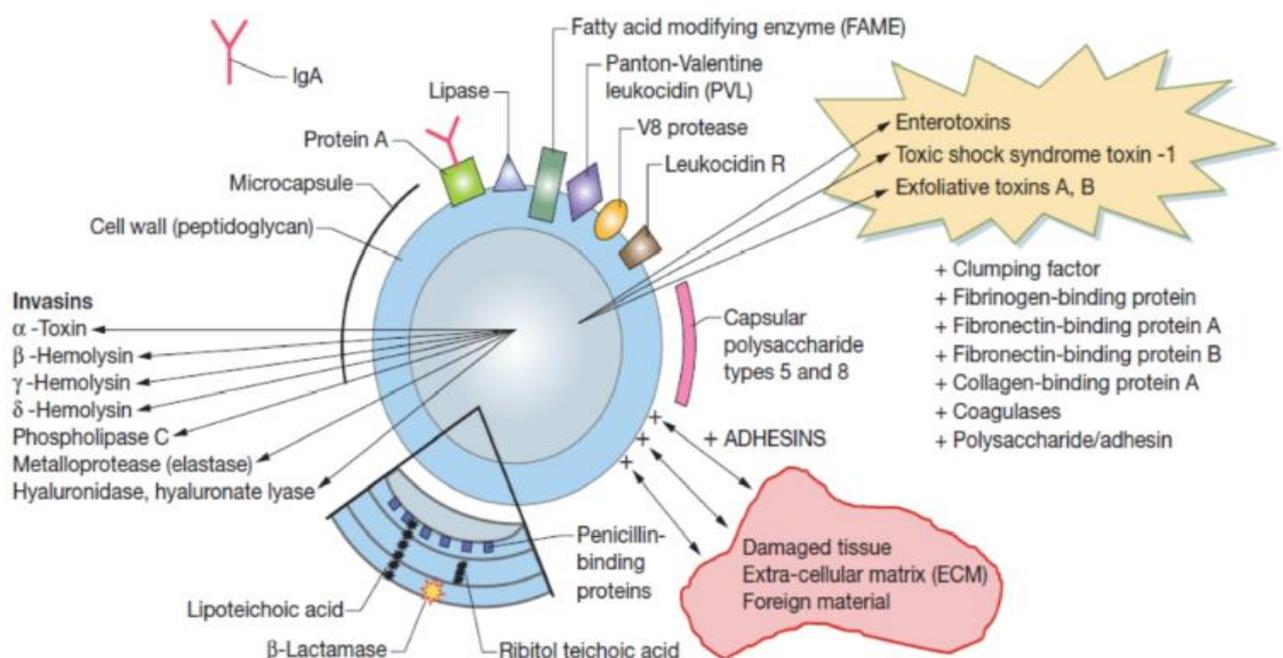


Figure 02 : Facteurs de virulences de *S.aureus* (lowy et al., 1998).

1-1- Principaux facteurs de virulence de *S.aureus* :

Facteurs de Virulence	Gènes	Fonctions
Protéines de Surface	<i>fnbA, fnbB</i> et <i>cna</i>	Liaison à la fibronectine, au collagène, etc.
Capsule	<i>Cap</i>	Inhibe la phagocytose et l'adhérence aux cellules épithéliales, endothéliales et aux monocytes
Entérotoxines (A, B, C, D, E et F)	<i>Ent</i>	Neurotoxine ayant une activité superantigène sur les lymphocytes T
Protéinases	<i>Ssp</i>	Hydrolysent les protéines
Protéine A	<i>Spa</i>	Liaison au fragment Fc de l'immunoglobuline G et inhibition de la phagocytose
Hémolysines (alpha, beta, delta et gamma)	<i>hla, hlb, hld</i> et <i>hlg</i>	Lyse les érythrocytes
Lipases et phospholipases	<i>Plc</i>	Activité enzymatique sur les lipides et les phospholipides
Exfoliatines A et B	<i>eta, etb</i>	Toxine causant la perte des couches superficielles de la peau dans le syndrome de la peau ébouillantée
Coagulase	<i>Coa</i>	Réagit avec la prothrombine pour former un complexe qui peut cliver le fibrinogène et causer la formation d'un caillot de fibrine
Déoxyribonucléase	<i>Nuc</i>	Enzyme hydrolysant l'ADN
Toxine-1 du syndrome de choc (TSST-1)	<i>Tst</i>	Activité superantigénique
Leucocidine (PVL)	<i>lukR, lukF</i> et <i>lukS</i>	Inhibe la phagocytose par les granulocytes et les macrophages tout en les détruisant
Facteur d'agglutination	<i>clfA</i>	Liaison aux fibrinogènes
Staphyloferrine B	NWMN_2079-2082	Sidérophore

Bactériocines	<i>Bsa</i>	Inhibe les bactéries à Gram négatif
Staphylokinase	<i>Sak</i>	Liaison au plasminogène et transformation en plasmine qui a une activité fibrinolytique et protéolytique. Aide à la dissémination

Tableau 04 : Principaux facteurs de virulence de *S.aureus*. (Dissemond J, 2009).

1-2- Les entérotoxines :

Les entérotoxines staphylococciques sont de potentiels agents d'intoxications alimentaires staphylococciques suite à la consommation d'aliments contaminés, elles sont thermostables (Tableau 6), résistants aux enzymes protéolytiques et assez stables sur une large gamme de pH (Bendahou et al., 2009 ; Di Giannatal et al., 2011) agissant sur les récepteurs neurovégétatifs mésentériques. Elles sont caractérisées par leur faible masse moléculaire compris entre 27.8 et 34.1 kDa, leurs points isoélectriques et leur sérotypie. Les propriétés biologiques des entérotoxines peut rester inchangé après la pasteurisation (Asao et al., 2003 ; Holechová et al., 2004). Selon Anderson et al. (1996), l'entérotoxine A (SEA) préserve certaines de ses activités biologiques après 28 min à 121°C.

La production d'entérotoxines staphylococciques peut commencer à partir d'une faible concentration bactérienne ($10^3/g$) avec une incubation de 2h à 37°C. chez l'humain, les symptômes se manifestent après ingestion d'une petite quantité de toxine (0.5ng/ml) (Balaban et al., 2000 ; Le Loir et al., 2003 ; Di Giannatal et al., 2011).

Sur le plan antigénique, neuf types majeurs de la SE ont été reconnus et distingués SEA, SEB, SEC, SED, SEG, SEH, SEI et SEJ (Zhang et al., 1998). Leur production est assez répandue chez *S.aureus*, elles ne sont élaborées que par certaines souches appelées staphylocoques entérotoxigènes. Toutes ces toxines présentent une activité superantigéniques en interagissant avec les cellules présentatrices d'antigènes et stimulent la prolifération non spécifique des cellules T (Balaban et al., 2000 ; Nehal et al., 2010). Parmi les superantigènes seule les SE ont une activité émétique. L'activité superantigène et émétique de la SE sont deux

fonctions distinctes localisées sur des domaines distincts de la protéines (**Hovde et al., 1994 ; Dinges et al., 2000**).

A ce jour, 24 entérotoxines staphylococciques différentes (SEA – SEIV) ont été identifiées. Elles ont, dans un premier temps, été identifiées grâce à leurs différentes propriétés antigéniques (SEA à SEJ). Depuis, le développement des techniques de séquençage a accéléré la découverte de nouveaux types d'entérotoxines (SEK à SEV). Ces SE, produites par *S. aureus*, présentent de fortes similarités en terme de structure, de séquences peptidiques et de fonction (**Le Loir et al., 2003**).

En ce qui concerne les aliments, les toxines identifiées lors de TIA sont les types A à E et H mais les plus courantes sont les types A et D (qui peuvent être associés). Lors d'intoxications elles proviennent exclusivement de *S.aureus*, la plupart des souches de staphylocoques incriminées sont d'origine humaine (environ 80%). Les autres souches sont d'origine ovine ou non spécifique d'espèce (environ 15%). La contamination des aliments lors de leur fabrication par les manipulateurs est alors la principale cause des intoxications staphylococciques (**Kérouanton et al., 2007**).

Ces toxines peuvent se retrouver dans les aliments lorsque ceux-ci sont contaminés par des souches de *S.aureus* entérotoxinogènes producteurs d'entérotoxine. Lorsqu'elles sont ingérées, ces toxines se révèlent fortement émétisantes et représentent l'une des principales causes de toxi-infections alimentaires (**Patterson M. F, 2005**) La quantité d'entérotoxines nécessaire à l'intoxication dépend de la sensibilité d'un individu à ces toxines donc de son poids et de son état de santé général, ainsi que du type de toxines.

Résistance des entérotoxines au traitement thermique	Durée (min)
D 100°C (en milieu lait)	70
D 110°C (en milieu lait)	26
D 120°C (en milieu lait)	9.4

Tableau05 : Résistance des entérotoxines au traitement thermique (**Patterson M. F, 2005**)

D (temps de réduction décimale d'un micro-organisme ou d'une toxine exprimé en minutes). Durée : durée nécessaire à la température pour détruire 90% des germes ou des toxines initialement présents.

1-2-1- Nomenclature et propriétés :

Les études sur les ES (SE en nomenclature internationale anglo-saxones pour Staphylococcal Enterotoxin ont débuté suite à la mise en évidence de *S. aureus* dans des aliments incriminés lors de toxi-infections alimentaires.

Les toxines de types SEA, SEB, SEC, SED et SEE représentent les ES dites : classiques, car ils sont bien caractérisées et identifiées depuis de nombreuses années et dont l'implication dans des cas d'intoxications alimentaires a été démontrée par de nombreux auteurs (**Jones et Kahn, 1986 ; Betley et Mekalanos, 1988 ; Couch et al., 1988 ; Bayles et Iandolo, 1989 ; Dingues et al., 2000**). Pour ces toxines, la séquence peptidique a été élucidée avant de connaître la séquence nucléotidique. Ce fut le cas notamment pour la toxine de type A - SEA (**Huang et al., 1987**), B - SEB (**Huang et Bergdoll, 1970**) et C - SEC (**Schmidt et Spero, 1983**). Le sérotype C est subdivisé en groupes (SEC1, SEC2, SEC3, SEC bovine, SECovine, SECcaprine et SECcanine) classés sur la base de différences d'activité superantigénique et en fonction de l'hôte auquel elles sont associées (**Bergdoll et al., 1965 ; Marr et al., 1993**). L'entérotoxine staphylococcique SEF a été décrite en 1981 (**Bergdoll, 1981**) mais a été renommée quelques années plus tard TSST1 compte tenu de son manque d'activité émétique contrairement aux autres entérotoxines staphylococciques classiques (**Blomster-Hautamaa et al., 1986**).

En 2004, une nouvelle nomenclature concernant les superantigènes exprimés par *S. aureus* a été proposée pour la désignation de ces nouvelles ES (**Lina et al., 2004**). En conséquence, seules les toxines induisant une activité émétique après administration par voie orale chez l'animal ont été désignées « ES ». Les autres toxines, pour lesquelles aucune activité émétique n'a été démontrée, ont été appelées

« staphylococcal enterotoxin-like (SEI) » pour indiquer que leur rôle dans des intoxications alimentaires n'a pas été confirmé. Ces nouveaux types d'ES ont donc été désignés SEIJ à SEIR et SEIU puisque, à l'exception de SEH, SEI et SEG, aucune de ces toxines ne présentait d'activité émétique *in vivo* (Ren et al., 1994 ; Jarraud et al., 2001 ; Orwin et al., 2001 ; Letertre et al., 2003a ; Omoe et al., 2003 ; Su et Wong 1996 ; Munson et al., 1998).

Les entérotoxines staphylococciques sont riches en lysine, acide aspartique, acide glutamique et tyrosine. La plupart possèdent un pont disulfure nécessaire à leur conformation et probablement impliqué dans l'activité émétique. Elles sont très stables, résistantes à la plupart des enzymes protéolytiques telles que la pepsine ou la trypsine et gardent ainsi leur activité après ingestion d'aliments contaminés, dans le tube digestif. Elles résistent aussi à la chymotrypsine, la rénine et la papaïne. Néanmoins, SEB et SEC1 ont pu être hydrolysées en peptides par une digestion trypsique modérée au niveau du pont disulfure. SEB peut être détruite par la pepsine à pH 2 mais est résistante à la pepsine à des pH supérieurs, qui sont les conditions généralement rencontrées dans l'estomac après l'ingestion de nourriture (Bergdoll, 1983). Les ES sont également très thermorésistantes. Elles sont réputées plus thermorésistantes dans les aliments qu'en milieu de culture, en condition de laboratoire mais elles peuvent être inactivées par les traitements thermiques utilisés en appertisation lorsqu'elles sont présentes en faible concentration (Bergdoll, 1983).

Les traitements thermiques en milieu acide aboutissent généralement à une perte d'activité immunologique par dégradation des acides aminés et à la perte concomitante d'activité biologique. Cependant, il a été montré que SEA et SED peuvent être indétectables (perte de reconnaissance sérologique) mais rester actives, c'est-à-dire toxiques, après traitement thermique (Bennett, 1995). L'inactivation thermique de SEA, SEB et SEC est variable selon la matrice alimentaire et le pH (Schwabe et al., 1990). Il est ainsi difficile de prévoir l'impact de traitement thermique sur l'activité des ES, puisque celle-ci dépend du type d'ES, de leur concentration et de la matrice alimentaire. En effet, les ES étant des protéines, il est admis que ces dernières forment des liaisons faibles avec les composés de la matrice alimentaire aboutissant ainsi à un effet protecteur. De plus, dans certains cas, l'inactivation thermique est spontanément réversible, en pH alcalin (Schwabe et al., 1990) ou par un traitement à l'urée (Akhtaret al., 1996). Dans l'ensemble, ces données montrent que les ES résistent à des conditions (traitement thermique, pH

acide) qui détruisent facilement *S. aureus* lui-même. Ces conditions extrêmes illustrent bien le grand nombre de situations dans lesquelles *S. aureus* est capable de se développer, survivre et produire des toxines (Tableau 06) (Bennett, 2001; Genigeorgis, et al., 1971; Genigeorgis et Sadler, 1966)

Facteur	Croissance de <i>S. aureus</i>		Production d'entérotoxines staphylococciques	
	Extrêmes	Optimum	Extrêmes	Optimum
Température (°C)	7 – 47	37	10 - 45	40
pH	4 – 10	6 – 7	4 - 10	~ 7
A _w	0,83 - > 0,99	> 0,99	0,84 - > 0,99	> 0,99
[NaCl]	0 – 20 %	0 – 4 %		

Tableau06 : Conditions de croissance de *S.aureus* et de production d'entérotoxines

1-3- Nucléase :

Les souches de *S. aureus* produisent une nucléase thermostable extracellulaire (thermonucléase) d'une masse moléculaire de 17000 Da. La thermonucléase est une enzyme à base de calcium. Cette enzyme est capable de dégrader à la fois les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN) en hydrolysant leurs liaisons phosphodiester. La thermonucléase codée par le gène *nuc* est un important facteur de virulence de *S. aureus*. De plus, l'amplification du gène *nuc* a été utilisée pour confirmer la présence de *S. aureus* (Esan et al., 2009; Kateete et al., 2010). Cette enzyme démontre une stabilité structurelle avec des entérotoxines staphylococciques (Brakstad et al., 1992; Meyrand 1999, Tang et al., 2008). L'amplification par PCR du gène *nuc* pour la détection de *S. aureus* a été réalisé dans plusieurs études (Hein et al., 2001; Alarcón et al., 2006). Le gène de la nucléase thermostable a été séquencé et caractérisé, le gène *nuc* fait 966 pb, comme l'ont rapporté Shortle et al. (1983).

La corrélation entre le gène *nuc* et la production d'entérotoxines a déjà été rapportée (Cremonesi et al., 2005). Les méthodes laborieuses et coûteuses utilisées pour la détection des entérotoxines dans l'analyse de routine des produits alimentaires

peuvent être remplacées par la détection du gène *Nuc* qui représente la présence de *S. aureus* entérotoxigène (Szabo, 2001).

C'est une désoxyribonucléase qui a une activité exo-et endo-nucléasique, autrement dit ribonucléasique qui lui permet de dégrader l'ADN et aussi l'ARN des cellules de l'hôte (Hu Y et al., 2012). La production de désoxyribonucléase thermolabile est très répandue dans les différentes espèces du genre *Staphylococcus*. Une enzyme thermostable (thermonucléase) est produite par toutes les souches de *S. aureus* et 5 % des souches de staphylocoques à coagulase négative appartenant aux espèces : *S.hyicus*, *S.intermedius*, *S.lugdunensis* et *S. schleiferi*. (Fleurette J, 1989).

Elle est active à pH alcalin en présence de calcium (Hu Y et al., 2012). La nucléase thermostable est une 5'phospho-diésterase, on lui trouve différentes appellations à savoir nucléase micrococcal, une désoxyribonucléase, une DNase, thermonucléase, mais le plus souvent on se réfère à l'enzyme sous forme de nucléase ou de Nuc. (Fuchs et al., 1967).

1-4- La coagulase :

La coagulase est l'une des enzymes extracellulaires qui provoquent la polymérisation du fibrinogène en fibrine, elle est produite par toutes les souches de *S.aureus*. C'est une protéine intracellulaire qui encourage spécifiquement la liaison au fibrinogène (Boden et Flock 1989). De plus, la coagulase se lie à une protéine pour produire un complexe moléculaire avec une activité de type thrombine, qui convertit le fibrinogène en fibrine autour du site d'infection. Cette exoenzyme capable de coaguler le plasma sanguin constitue un moyen d'identification simple et rapide de l'espèce. La sécrétion de la coagulase est le caractère taxonomique essentiel de l'espèce (Ferron ,1984). La présence de cette enzyme définit l'espèce *S. aureus* (EL Kouri et al., 1998 ; Fasquelle ,1974).

1-4-1- Coagulase libre

La coagulase libre, ou staphylocoagulase, est une enzyme extracellulaire thermostable exprimée pendant la phase exponentielle de la croissance bactérienne. D'origine chromosomique, elle est capable de coaguler le plasma humain ou de lapin citaté, hépariné, oxalaté ou EDTA (Jeljaszewicz et al., 1983). Elle induit la formation d'anticorps capables d'empêcher son action biologique. En se liant à une coaguline plasmatique proche de la prothrombine dans le plasma, elle forme un complexe nommé staphylothrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine (Garnier et al., 2006). Cette réaction entraîne la coagulation locale du plasma

autour de la bactérie en formant une coque fibrine cela permet de la protéger de la phagocytose et favoriser la dissémination, elle est à l'origine des thrombophlébites suppurées (Avril et al., 2003 ; Le Minor et Veron , 1990). Facteur primordial dans la constitution des septicémies (Ferron ,1984).

Sa synthèse nécessite la présence d'acide glutamique, d'histidine et de lysine (Le Minor et Veron, 1990). Son PM (Poids Moléculaire) varie selon les souches de 31 à 58 kDa et son pI (point isoélectrique) est de 5,5, sa formation ne nécessite pas la présence de calcium.

1-4-2- Coagulase liée (clumping factor), (ou facteur d'affinité pour le fibrinogène)

Le clumping factor est un constituant de la paroi bactérienne C'est une protéine, très riche en lysine avec un poids moléculaire (PM de 21 kDa, et d'un point isoélectrique de 10,3) elle est présente chez presque toutes les souches d'origine humaine ; est moins fréquente chez les souches d'origine animale (Le Minor et Veron, 1990).

Etant une substance insoluble la coagulase liée est présente chez certaines espèces de staphylocoques coagulase négative, telles *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* et certaines souches de *S. intermidis* (Avril et al., 2003 ; Le Minor et Veron , 1990).

Considérer comme constituant de la paroi bactérienne la coagulase est diffusé dans le milieu après autolyse, elle réagit directement avec le fibrinogène ou des monomères solubles de fibrine (Jeljaszewicz et al., 1983) cette réaction provoque une agglutination chez 98% des souches de *S. aureus* en raison du caractère dimérique du fibrinogène natif (Avril et al., 2003 ; Le Minor et Veron, 1990). Le clumping factor ne dégrade pas le fibrinogène en fibrine mais se fixe sur son extrémité carboxy-terminale (Le Minor et Veron, 1990). Elle est responsable de la formation d'une sorte de coque autour des bactéries qui deviennent ainsi résistants à la phagocytose et entraînent la formation d'emboles septiques (Fauchere et Avril, 2002 ; Ferron ,1984).

2- Régulation de la production des facteurs de virulence de *S. aureus*

Le fort pouvoir pathogène de *S. aureus* est étroitement lié à l'expression de nombreux facteurs de virulence. Tous les pathogènes ont besoin d'exprimer tout un arsenal de facteurs de virulence pour envahir et se multiplier à l'intérieur de l'hôte. L'expression de ces facteurs nécessite une coordination délicate qui est assurée par des systèmes de régulation spécifiques.

Le génome de *S. aureus* se caractérise par sa complexité et sa plasticité, Il s'agit d'un chromosome circulaire qui comprend $2.82.10^6$ à $2.9.10^6$ paires de bases (pb). De plus il contient en général un plasmide de 20 000 à 25 000 pb contenant une trentaine de gènes. Le génome de *S. aureus* a été séquencé pour 6 souches de *S. aureus* [(Baba et al., 2002 ; Holden et al., 2004 ; Kuroda et al., 2001) 84% du génome est codant et entre 2592 et 2748 gènes ont été identifiés et contiens un pourcentage en GC% égale à 33%.

Chez *S.aureus* il existe un très grand nombre de gènes liés à sa 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 (Kuroda et al., 2001).

La synthèse des facteurs de virulence se déroule en étapes, la première se voit dans la phase exponentielle de croissance bactérienne, ce sont surtout les gènes codant pour des adhésines qui sont activés. Les seconds sont les gènes des toxines qui prennent le relais (figure 03). Cette activation séquentielle, et la synthèse de l'ensemble de facteurs de virulence est sous la dépendance du système de régulation de la virulence appelé *agr* (accessory gene regulator). permettant à *S.aureus* de contrôler l'expression de ses gènes en réponse à la densité bactérienne présente dans l'environnement avoisinant. C'est la communication cellule-cellule (Bronner et al., 2004 ; Dufour et al., 2002 ; Yarwood et al., 2003).

Lors de la phase exponentielle de croissance, en faible densité *S. aureus* privilégie les constituants de l'enveloppe et les composants de surface permettent l'adhésion de la bactérie et l'échappement aux défenses de l'hôte. (Lowy et al., 1998). Au début de la phase de décélération, l'expression du gène régulateur *agr* est induite et entraîne la sécrétion de nombreuses exotoxines favorisant la dissémination de la bactérie. Lors d'un stress métabolique, *S. aureus* à la capacité de modifier son phénotype permettant la persistance de la bactérie. (Figure 03). (Lowy et al., 1998)

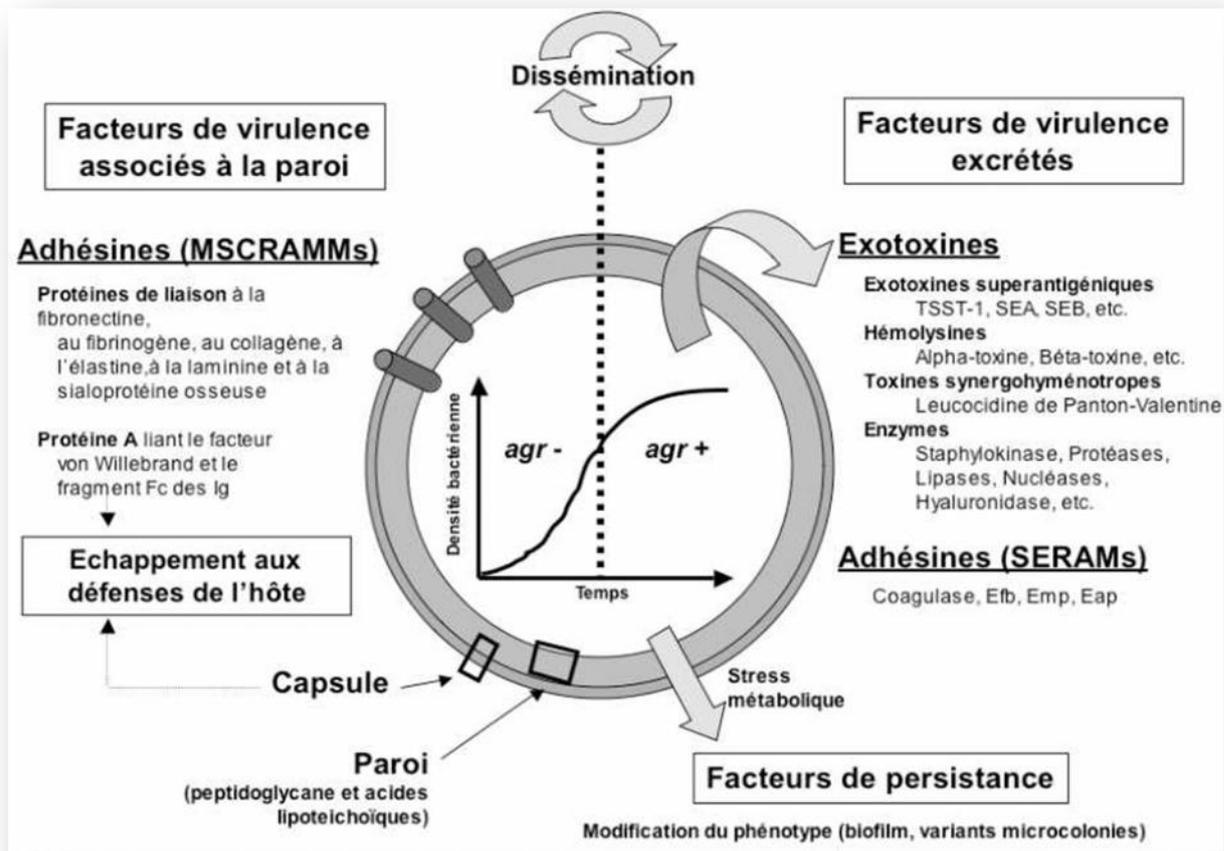


Figure 03 : Expression des facteurs de virulence et de persistance selon la croissance bactérienne et l'expression consécutive d'*agr* (Lowy et al., 1998).

(MSCRAMM : Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules.

SERAM : Secretable expanded repertoire adhesive molecules.)

Chapitre III

Réaction de polymérisation en chaine (PCR)

1- Définition

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique d'amplification enzymatique la plus connue pour la détection de microorganismes pathogènes ; réalisée grâce à la *Taq* polymérase, elle permet d'obtenir rapidement une quantité importante et exploitable d'un fragment précis d'ADN (environ 100 milliards de copies d'une molécule d'ADN en quelques heures). (Templeton, 1992).

La PCR a été inventé par Kary Mullis en 1983. Cette réaction implique la synthèse d'ADN cible par deux amorces oligonucléotidiques et ADN polymérase (la *Taq poly.*) qui a eu lieu dans un thermocycleur. Le principe et les conditions qui en découlent sont très simples. Il s'agit de réaliser une succession de réactions de réplication d'une matrice double brin d'ADN, chaque réaction met en œuvre deux amorces oligonucléotidiques, ces amorces définissent alors en la bornant, la séquence à amplifier (Mullis *et al.*, 1986).

2- Principe de la PCR

Dans le procédé, un fragment d'ADN spécifique double brin est amplifié pendant un processus cyclique à trois paliers comprenant: l'ADN cible double brin qui est dénaturé à haute température principalement de 94 à 95 °C. A ces températures plus élevées, les liaisons hydrogène entre les bases se rompent, mais les liaisons covalentes entre le désoxyribose et les phosphates restent. L'étape qui suit qui est celle d'hybridation des amorces au brin modèle. Le mélange réactionnel est refroidi à 45-60°C, chacune des amorces reconnaît et se lie à sa séquence complémentaire. Les amorces sont positionnées de manière à ce que leur extrémité 3' soit face à face afin que la synthèse d'ADN ait lieu dans la région se trouvant entre les deux amorces. Lors de la dernière étape, l'ADN polymérase se lie à l'extrémité 3' de chaque amorce liée et utilise le dNTPs afin de pouvoir synthétiser un nouveau brin d'ADN dans la direction 5' à 3'. Lors de cette étape, l'ADN polymérase possède une température optimale pour la réplication d'ADN de 72°C. Après un cycle de la réplication PCR, une nouvelle copie de chaque brin d'ADN produit est synthétisée et le nombre de cycle peut varier entre 20 et 40. (Reece, 2004). La technique de PCR présente les avantages distincts de la rapidité, de la spécificité, de la sensibilité, d'efficacité.

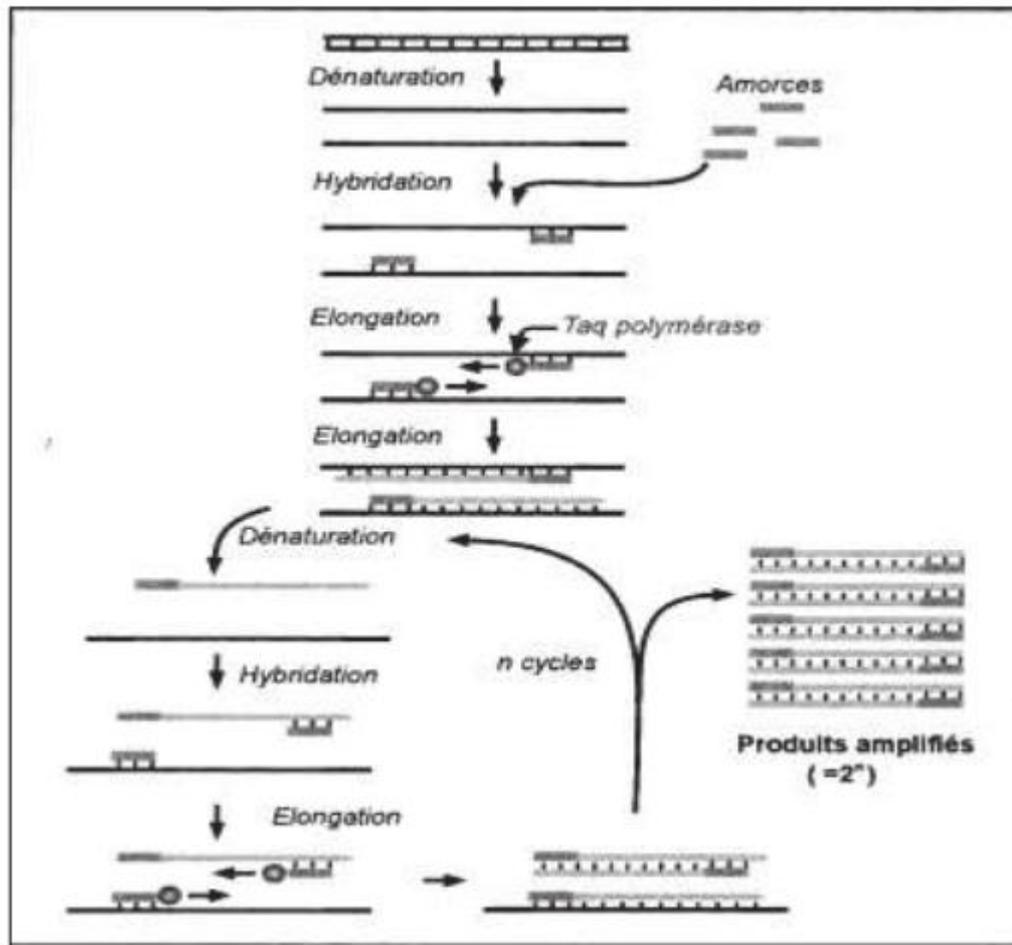


Figure 4 : principe de la réaction PCR. (Mamette, 2002)

3- Détection et analyse des produits PCR

Le produit d'une PCR est constitué d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse des produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). L'ADN est révélé par une coloration au bromure d'éthidium. Ainsi, les produits sont-ils visibles instantanément par trans-illumination aux ultraviolets (Nîmes, 2007)

Des produits de très petite taille sont souvent visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles-mêmes. Selon les conditions réactionnelles, il arrive que des fragments non spécifiques d'ADN soient amplifiés en quantité plus ou moins abondante, formant des bandes nettes ou des « traînées » (smear). (Nîmes, 2007)

4- Performances de la technique PCR

La sensibilité des tests varie suivant les études, de 11 à 100 %, et la majorité des publications rapportent des spécificités proches de 100 %. Les performances de la PCR en terme de sensibilité sont très dépendantes du type d'échantillons (prélèvements respiratoires, urines, sérums, etc.) et de l'ancienneté des études, l'amélioration des méthodes d'extraction et l'avènement de la PCR en temps réel ayant contribué à l'augmentation de la sensibilité (Yang *et al.*, 2010).

L'usage de la PCR pour la détection des gènes de virulence chez *S.aureus* n'as était initier qu'à partir de 1990. Les gènes ciblés ont été préférentiellement ceux codant les entérotoxines, le choix s'est également porté sur des gènes spécifiques de cette espèce, comme le gène *nuc* de la thermonucléase. (Ikeda *et al.*, 2005). Diverses méthodes de détection de *S.aureus* sont présentées dans le tableau suivant :

Méthodes de détection	Temps	Quantité limite d'échantillon	Autres avantages	Références
ELISA (Technique de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée).	10 h	0.5ng/mL dans le tampon de dosage.	Détection simple, rapide, sensible et spécifique d'entérotoxines.	(Poli <i>et al.</i> , 2002).
IMS (Spectrométrie de mobilité ionique).	40 min	$1.5 * 10^5$ UFC	Méthode de détection facile, pratique et rapide pour un large éventail de pathogènes.	(Sung <i>et al.</i> , 2013).
PCR classique	8.5 h	10 à 90 UFC / g dans les aliments	Difficulté à obtenir une préparation d'ADN, les procédures sont plutôt compliquées, propres environnement.	(Nakano <i>et al.</i> , 2004).
PCR temps réel	1.53 h	$1.5 * 10^2$ copie du gène <i>nuc</i> à $6.4 * 10^2$	Le nombre de copie d'échantillon peut être mesuré, Rapide, haute spécificité et haute sensibilité.	(Hein <i>et al.</i> , 2001).

Puce d'ADN	60 min	10 ¹ UFC culture pré-enrichi.	Nécessité d'un bain-marie, d'un fluorimètre.	(Shin et al., 2015).
Technologie Biosensor	30 min	1000 cells/ml en culture pure.	Détection rapide.	(Arora et al., 2013).
LAMP (amplification isotherme médier par des boucles).	60 min	100 fg ADN/tube et 10(4) UFC/ml.	Spécificité, fonctionnement simple.	(Zhao et al., 2013).

Tableau 07 : Comparaison entre différentes méthodes de détection de *S.aureus*

(Xihong Zhao et al., 2016)

Chapitre IV

Les toxi-infections alimentaires

1- Définition et généralité

Les TIAC (Toxi-Infection Alimentaire Collective) sont définies comme la survenue d'au moins deux cas groupés, d'une symptomatologie similaire, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire (**Haeghebaert et al., 2002**). Les intoxications alimentaires sont considérées comme l'une des principales causes de toutes les maladies d'origine alimentaire. Elles ont un impact majeur sur la sante publique dans le monde entier de ce fait elles sont à déclaration obligatoire (**Delmas et al., 2006**).

Les symptômes associés à de telles intoxications sont des douleurs abdominales et des céphalées, suivies de vomissements incoercibles (signe caractéristique), avec éventuellement de la diarrhée, et de fièvre (**Leyral et Vierling, 2007**). Ils sont présents rapidement après l'ingestion de l'aliment contaminé (2 à 5 heures), (Tableau 08). La guérison intervient généralement dans les 24 heures et les hospitalisations sont assez rares, principalement dues à des déshydratations. Les cas les plus graves sont observés chez les sujets sensibles (enfants et personnes âgées).

Les bactéries sont la principale cause des intoxications alimentaires. *Salmonella*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia* et *Listeria monocytogenes* sont les principales bactéries responsables d'infections alimentaires liées à leurs présences dans l'aliment. Les symptômes apparaissent plus de 12 h après l'ingestion de l'aliment contaminé, suite au développement de la bactérie dans l'organisme, et dans certains cas, à la production de toxines. A l'inverse, l'apparition de symptômes suite à une intoxication alimentaire est très rapide de l'ordre de quelques heures, car elle est liée à la consommation de toxines préalablement produites par la bactérie dans l'aliment. Les bactéries responsables sont généralement *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* et *Bacillus cereus*. (**Delmas, et al., 2006**).

Bactéries pathogènes	Aliments incriminés	Durée d'incubation	Toxicité et fréquence	Symptômes
Salmonelles (<i>Salmonella typhimurium</i> DT104)	Viandes, volailles, oeufs, lait cru, fruits de mer.	De quelques heures à 4-5 jours (surtout 24 h).	-Bénigne, sauf enfants et sujets immunodéprimés -Très fréquente.	-Douleurs abdominales, migraines, frissons, fièvre importante, vomissements, diarrhées, prostration. Les symptômes durent de 2 à 3 jours. - Grave chez les sujets immunodéprimés et les jeunes enfants. -Complications possibles si passage de la bactérie dans le sang (septicémie). -Complications articulaires (arthrite).
<i>Staphylococcus aureus</i> .	Lait, fromages, crèmes glacées, viandes, volailles, charcuterie, poissons, plats cuisinés (plats subissant des Manipulations humaines)	1 à 6 heures.	-Bénigne, sauf nourrissons -Fréquente.	-Nausées, vomissements violents, douleurs abdominales, parfois diarrhées, parfois fièvre. -Chez le jeune enfant, risque de déshydratation en raison de la diarrhée.
<i>Escherichia coli</i> . 0157:H7	Viandes surtout, cresson, eau, lait cru.	3 à 9 jours.	-Grave -Rare (cas signalés au Japon et aux Etats-Unis)	-Symptômes peuvent persister plus d'une semaine, diarrhées abondantes et sanglantes, nausées, vomissements, parfois insuffisance rénale, qui peut être mortelle.
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lait, fromages, charcuterie, volailles, produits de la mer (fumés).	1 jour à plusieurs semaines (jusqu'à 2 mois).	-En général bénigne. -Très grave chez les femmes enceintes, les jeunes enfants, les sujets immunodéprimés.	-Très variables en fonction des individus. -Passe parfois inaperçu (fausse grippe) avec diarrhées et douleurs abdominales. -Séquelles neurologiques possibles en cas de méningite.

			-Peu fréquent (200 cas/an). Environ 25-30% de cas.	-Très grave chez la femme enceinte, avortements au 2e trimestre de grossesse, accouchements prématurés. -Très grave chez les sujets affaiblis ou immunodéprimés, très jeunes enfants. -Antibiothérapie très efficace.
<i>Campylobacter</i> (<i>Campylobacter jejuni</i>)	Volailles, viandes, crustacés, lait cru, eau dans certains pays	1 à 10 jours (le plus souvent entre 2 à 5 j).	-Bénigne, sauf jeunes enfants -Fréquente	-Douleurs musculaires, migraines, fièvre, diarrhées liquides, douleurs abdominales, nausées. - Grave chez le très jeune enfant : risque de septicémie et de méningite.
<i>Clostridium perfringens</i>	Aliments cuits puis mal protégés, plats cuisinés surtout à base de viande.	9 à 24 heures.	-En général bénignes chez l'adulte. - À prendre très au sérieux chez le jeune enfant.	-Diarrhées, douleurs abdominales, rarement fièvre ou vomissements. -Chez le jeune enfant, le type C peut provoquer des nécroses intestinales.

Tableau 08 : Bactéries responsables de cas de TIAC et pathologies associées (Nugon-Baudon et Mollier, 2002)

Les TIAC persistent dans les pays industrialisés. L'importance de leur maîtrise est justifiée d'une part par le coût des manifestations aiguës et, d'autre part, par celui de la prise en charge des pathologies secondaires ou réactionnelles. Leur fréquence reste élevée malgré les mesures de surveillance et de prévention prises au niveau de la production, distribution et conservation des aliments. La contamination de ces aliments peut être le fait de la matière première (animale ou végétale), d'une contamination par l'environnement, l'homme ou un autre aliment (contamination croisée). Le contrôle de ces infections reste un objectif prioritaire en termes de sécurité alimentaire (Leyral et Vierling, 2007).

Les TIAC survenues en restauration collective représentent 70 % des foyers, dont un tiers en milieu scolaire. Un aliment est suspecté ou confirmé dans 80 % des foyers. Les viandes et notamment les volailles, ainsi que les aliments préparés à base

d'œufs sont les principaux véhicules des germes des TIAC. Le non-respect de la chaîne du froid, les erreurs dans le processus de préparation des aliments et un délai trop important entre la préparation et la consommation représentent les principaux facteurs favorisant la survenue d'une TIAC. (Nugon-Baudon et Mollier, 2002)

2- Intoxications alimentaires staphylococcique

Les toxi-infections alimentaires collectives staphylococciques sont provoquées par l'ingestion de toxines super-antigéniques staphylococciques, qui sont toutes émétisantes et présentent un risque sanitaire pour le consommateur, excepté la TSST-1. 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 (Vincenot et al., 2008). Cliniquement, ce type d'intoxication alimentaire est caractérisé par un délai d'incubation court (1 à 6 h) après l'ingestion de l'aliment, avec apparition de troubles gastro-intestinaux associant crampes abdominales douloureuses, vomissements et diarrhées. En général, il n'y a pas de signes généraux et l'évolution est le plus souvent favorable en l'absence de traitement. Néanmoins, la survenue d'un choc toxique staphylococcique est possible en cas d'intoxication massive (Vincenot et al., 2008).

Les propriétés émétisantes des SEs, en particulier de SEA, seraient dues à leur liaison avec les mastocytes présents dans la sous-muqueuse intestinale. La liaison de SEA à un récepteur encore inconnu des mastocytes, entraînerait la libération de sérotonine par dégranulation mastocytaire. La sérotonine libérée induirait la dépolarisation des nerfs entériques, en se liant à son récepteur 5-HT3 présent à la surface des neurones. La dépolarisation du nerf vagal résultante stimulerait les noyaux cérébraux responsables du réflex de vomissement (Hu et Nakane, 2014). La présence de *S. aureus* peut être d'origine humaine ou animale.

3- Contamination d'origine humaine

S. aureus, pathogène opportuniste colonise la peau et les muqueuses de l'homme et de nombreuses espèces animales à sang chaud (Williams, 1963). Bien qu'il existe de nombreux sites de colonisation chez l'homme, le nasopharynx est le site de portage le plus fréquent. Il a en effet été estimé que 27% de la population humaine est porteuse de *S. aureus* dans le nasopharynx (Wertheim et al., 2005). Les autres sites fréquents de portage sont la peau et le périnée (Wertheim, et al., 2005).

Même si le portage de *S. aureus* augmente le risque de contracter une infection liée à cette bactérie, l'homme ne présente généralement aucun symptôme lié à cette colonisation. De ce fait, au cours de la fabrication, préparation des aliments, une contamination de l'aliment par l'homme est possible si les conditions d'hygiène ne sont pas pleinement contrôlées (port de gants et de masques notamment).

Une revue récente de 816 cas de TIAC, répertoriés entre 1927 et 2006 principalement aux Etats-Unis, au Canada, en Europe et en Australie et dans lesquels des personnes ayant manipulé la nourriture ont été impliquées, a recensé les moyens de transmission des pathogènes aux aliments : les voies fécales et orales (mains contaminées après passage aux toilettes, vomissements) de personnes malades, convalescentes ou colonisées sont les plus souvent incriminées ; viennent ensuite les contaminations, essentiellement staphylococciques ou streptococciques, dues aux sécrétions nasales ou orales ainsi que les infections de la peau (**Todd et al., 2008**). Ces cas de TIAC ont été provoqués principalement dans des lieux de restauration (restaurant, hôtel...), lors d'événements animés par des traiteurs ou encore à la maison (**Todd et al., 2007**). Mais il arrive aussi que les contaminations aient lieu dans les usines de transformation des aliments (**Todd, et al., 2007**). Les aliments incriminés sont principalement des aliments cuisinés qui, après contamination, ont été stockés dans des conditions inadéquates (rupture de la chaîne du froid par exemple) permettant le développement des agents pathogènes (**Todd et al., 2007**).

De récents rapports de TIAC au Japon ou au Brésil incriminent le personnel des usines de conditionnement de lait et de production de lait en poudre ou de fromages dans la contamination (**Asao et al., 2003; Simeão do Carmo et al., 2002**).

4- Contamination d'origine animale

Vu que le *S.aureus* colonise la peau et les muqueuses des animaux à sang chaud de façon naturelle en les prenant pour niches écologiques il est souvent retrouvé sur les pis des femelles laitières dans les élevages ovins, caprins ou bovins. Comme agent pathogène quand le *S.aureus* provoquer des infections de la glande mammaire il arriver que le lait soit contaminé par *S. aureus*, vu que se dernier est une des causes majeures des mammites bovines, ovines et caprines Les carcasses de mammifères ou de volailles peuvent être contaminées au moment de l'abattage des animaux à partir de différentes sources : portage de *S. aureus* au niveau du pelage ou du plumage, de la peau de la mamelle, des narines des animaux, des muqueuses

génitales et du tube digestif; infections staphylococciques (infections cutanées, abcès) (Bergonier *et al.*, 2003; Ster *et al.*, 2005).

Durée moyenne d'incubation	Entre 30 min - 8 h (3 h en moyenne)
Population incriminée	Toute la population, toutes classes d'âge confondues
Principaux symptômes	-Nausées suivies de vomissements -Douleurs abdominales -Diarrhées -Vertiges -Frissons -Faiblesse générale parfois accompagnée d'une fièvre modérée -Lors des cas les plus sévères, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportés.
Durée des symptômes	18 - 24 h Les diarrhées et la faiblesse générale peuvent durer 24 heures de plus.
Durée de la période contagieuse	Entérotoxines non transmissibles de personne à personne. Aucune contagiosité.
Complications	La mortalité reste exceptionnelle (taux de mortalité : 0,02 %), atteignant les individus les plus sensibles à la déshydratation (nourrissons et personnes âgées) et les personnes atteintes d'une pathologie sous-jacente. Taux d'hospitalisation estimé : 16 % dans le cas où l'agent a été confirmé.

Tableau 09 : Caractéristiques d'une intoxication due à l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques (Todd, *et al.*, 2007).

Partie
expérimentale

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

1- Rappel des Objectifs

- ✓ Détermination de la prévalence des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments de restauration.
- ✓ Evaluations de la qualité bactériologique des aliments de restauration par rapport aux staphylocoques à coagulase positive.
- ✓ Caractérisation moléculaire par PCR des gènes de virulence (coagulase, nucléase et entérotoxine A).
- ✓ Identification de staphylococcus aureus par une technique rapide de PCR.

2- Durée et lieu d'étude

Notre recherche à durer 08 (huit) mois, de Novembre 2016 jusqu'au juin 2017. Les essais bactériologiques ont été réalisés au laboratoire de bactériologie des eaux et des aliments à l'institut pasteur d'Algérie (IPA).

3- Nature des échantillons

Les produits soumis à l'essai sont des aliments de restauration prélevés dans des cas d'inspections d'hygiène vétérinaire dans des établissements hôteliers, des restaurants (fastfood, pizzéria) des cantines universitaires et des intoxications alimentaires collectives déclarées dans la région d'Alger (MSPRH).

4- Matériels

4-1-Matériels de prélèvement :

-) Une glacière.
-) Des sacs stériles (type stomacher)
-) Une spatule pour prélèvement.

4-2-Matériels de laboratoire :

-) Une balance.
-) Un homogénéisateur de type stomacher.
-) Etuve de 37°C et 55°C

-) Verrerie : boîte de pétri, tube, pipette, flacon.
-) Réfrigérateur, chambre froide.
-) Pipettes et pipetteurs.

4-3-Les milieux de cultures :

-) Milieu Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium
-) Milieu Chapman.
-) Gélose Nutritive
-) Bouillon cœur cerveau

4-4-Matériels biologique :

-) Souche de référence *staphylococcus aureus* ATCC 29213.

4-5-Réactifs :

-) Bromure d'éthidium.
-) Plasma de lapin lyophilisé.
-) Kit d'extraction (enzyme et soulevant)

4-6-Matériels de PCR :

-) Extraction :
 - Kit d'extraction.
 - Micropipette 100 µL et 1000 µL.
 - Bain marie.
 - Réfrigérateur.
 - Vortex.
 - Centrifugeuse thermo régulé.
-) Préparation de mix :
 - Hotte PCR.
 - Micropipette. 10 µL, 100 µL, 200 µL et 1000 µL

) Amplification :

-Micropipette 10 μ L.

-Thermocycleur.

) Migration

- Générateur.

- Cuve à électrophorèse.

- Micro-onde.

- Balance.

- Chambre UV.

5- Méthodes

Le protocole adopté dans cette étude est récapitulé dans cette figure :

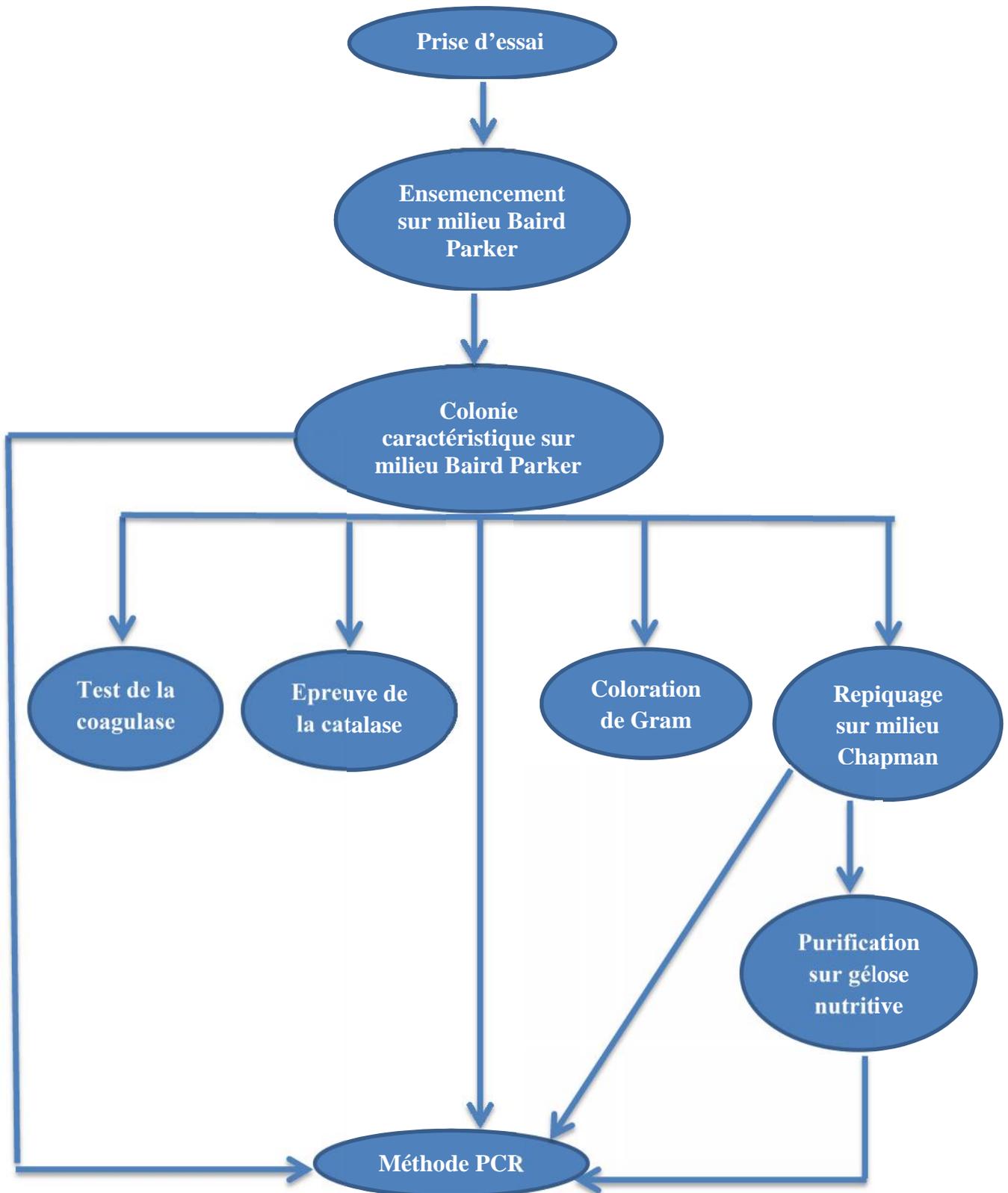


Figure 05 : protocole expérimentale

5-1- Échantillonnage :

Les échantillons ont été sélectionnés au hasard dans de différentes restaurations collectives : cantine universitaires, établissements hôteliers, et restaurants dans la région d'Alger.

5-2- Méthode de prélèvement :

Le prélèvement des aliments est réalisé à l'aide de spatule stérile et placés dans des sacs stérile transporté au laboratoire dans une glacière.

5-3- Mode opératoire :

5-3-1- Prise d'essai :

Les échantillons étaient prélevés et transportés au laboratoire dans une glacière. Les unités d'échantillonnage ont été conservées au réfrigérateur (0°C à 4°C) et analysées immédiatement ou dans les 24 heures qui suivent.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage. Il convient de suivre les instructions pour l'échantillonnage à des fins microbiologiques. **(ISO 6887-1)**

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales porte:

- sur les parties superficielles et profondes, notamment pour les produits en tranches ou hachées, les plats cuisinés à l'avance, **(arrêté interministériel N° 35-1998 du 24 janvier 1998)**

Dans le cas des examens microbiologiques effectués à la suite de toxi-infections alimentaires, il est nécessaire de pratiquer la recherche des germes pathogènes, toxinogènes et/ou de leurs toxines, aussi bien en surface qu'en profondeur. **(Arrêté interministériel N° 35-1998 du 24 janvier 1998)**

L'analyse est effectuée en utilisant 25 grammes d'aliment homogénéisé dans 225 ml de diluant de pré-enrichissement bouillon tryptone-sel (TSE) (institut pasteur, Algérie) (c'est un milieu nutritif non inhibiteur) à l'aide d'un homogénéisateur du type Stomacher. **(ISO 6887-1)**

6- Recherche des staphylocoques à coagulas positive

En conformité avec L'arrêté interministériel N°68-2014 du 25 Rajab 1435 correspondant au 21 Mai 2014 et avec ISO 6888-1

6-1- Isolement :

6-1-1- Ensemencement :

- 1- A l'aide d'une pipette pasteur stérile on transfère 0.1 ml de la dilution 10^{-1} (solution mère) de l'échantillon sur la surface d'une boîte de gélose Baird Parker (**institut pasteur, Algérie**), additionnée au jaune d'œuf et au tellurite de potassium, qui a été préalablement coulé dans les boîtes de Pétri 90mm.
- 2- On étale soigneusement l'inoculum sur la surface du milieu sans toucher les bords de la boîte avec l'étaleur.

-Incubation

Incuber les boîtes pendant 24 à 48h dans l'étuve à 37 °C.

6-1-2- Aspect de colonie :

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes 1mm de diamètre après 24h d'incubation et 1.5mm à 2.5 mm de diamètre après 48h d'incubation et entourée d'une auréole d'éclaircissement.

Les colonies non caractéristiques peuvent présenter l'une des morphologies suivantes :

-colonies noirs et brillantes avec ou sans bord blanc étroit, la zone claire est absente ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible.

-colonie grise dépourvue de zone claire

6-1-3- Recherche de la catalase :

La catalase à la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂) qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.

6-1-4- Recherche de la coagulase :

-) Prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et l'ensemencer dans un tube de bouillon cœur –cervelle (BHIB).
-) Incuber à 37°C pendant 24h.
-) ajouter 0.1ml de chaque culture a 0.3 ml du plasma de lapin dans des tubes stérile et incuber a 37°C.
-) En inclinant le tube, examiner la coagulation du plasma après 4h à 6h d'incubation, et si le test est négatif il faut le réexaminer après 24h.

6-2- Dénombrement des staphylocoques à coagulase positive :

Celon la formule suivante :

$$a = \frac{bc}{Ac} \times Cc + \frac{bnc}{Anc} \times Cnc$$

Ac : Est le nombre de colonies caractéristiques soumises au test de la coagulase.

Anc : Est le nombre de colonies non caractéristiques soumises au test de la coagulase.

Bc : Est le nombre de colonies caractéristiques qui ont répondu positivement au test de la coagulase.

bnc : Est le nombre de colonies non caractéristiques qui ont répondu positivement au test de la coagulase.

cc : Est le nombre total de colonies caractéristiques repérées sur la boîte.

cnc : Est le nombre total de colonies non caractéristiques repérées sur la boîte.

Calculer le nombre N de staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans l'échantillon pour essai :

$$N = \frac{a}{V (n1 + 0,1 n2) d}$$

:Est la somme des colonies de staphylocoques à coagulase positive identifiées sur l'ensemble des boîtes retenues.

V : Est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres.

n1: Est le nombre de boîtes retenues à la première dilution.

n2 : Est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution.

d : Est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (la suspension mère est une dilution).

6-3- Coloration de Gram :

La coloration de Gram est effectuée à partir des colonies suspectes. Les staphylocoques apparaissent en cocci Gram positives isolées, en diplocoques ou en amas sous forme de grappes de raisin.

6-4- Recherche de la fermentation du mannitol :

Repiquage des colonies caractéristique avec une pipette pasteur sur milieu Chapman (**institut pasteur, Algérie**) et incubation à 37°C pendant 24 à 48h.

6-5- Purification des isolats sur gélose nutritifs :

Avec une pipette pasteur on prend une colonie de souche isolé sur milieu Chapman et on la repique sur la gélose nutritive (**institut pasteur, Algérie**) et on procède à Incubation à 37°C pendant 24h.

6-6- Conservation sur milieu de conservation :

-) Par pique centrale dans le milieu de tube de conservation à l'aide d'une pipette pasteur.
-) Incubation à 37°C pendant 2h.

7- Méthode de PCR

7-1- Utilisation des amorces :

-) les amorces, doivent être préparées à des concentrations de 100 μmol (solution stock) et de 10 μmol (solution de travail) (diluer la concentration avec de l'eau double distillée stérile).
-) Bien identifier le nom de l'amorce sur le tube.
-) conserver à une température de -20°C (solution stock et solution de travail)



Figure 06 : une amorce

Gene	Amorces	Taille du produit amplifié	Source
Coagulase	forward: ATAGAGATGCTGGTACAGG reverse: GCTTCCGATTGTTTCGATGC	627, 710,910pb	Dewanand Rajaram Kalorey et al 2007
Nucléase	forward: CGATTGATGGTGATACGGTT reverse: ACGCAAGCCTTGACGAACTAAAGC	279pb	Dewanand Rajaram Kalorey et al 2007
Entérotoxine A	forward: AAAGTCCCGATCAATTTATGGCTA reverse: GTAATTAACCGAAGGTTCTGTAGA	216pb	Dewanand Rajaram Kalorey et al 2007

Tableau 10 : les amorces utilisées

7-2- Extraction d'ADN :

) Protocole du kit Invitrogen

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

L'ADN a été extrait directement à partir de cultures jeunes de 18 à 24h.

- ✓ Avec une pipette graduée on met 1 ml du tampon TE dans des tubes coniques
- ✓ A l'aide d'un écouvillon stérile ou une pipette pasteur on racle des colonies à partir de la boîte pétri et on les mets dans ces tubes.
- ✓ On centrifuge les tubes pendant 10min.
- ✓ Récupérer le contenu du tube et jeter le surnageant.
- ✓ Ajouter 18µl de genomic digestion buffer et secouer le vortex pendant 1min.
- ✓ Additionner 20µl de protéine k.
- ✓ Ajouter 200µL de genomic lysis buffer et on secoue au vortex.

- ✓ Incuber à 55°C pendant une heure.
- ✓ Ajouter 200µl d'éthanol absolue.
- ✓ Secouer au vortex.
- ✓ Transférer la solution vers des colonnes.
- ✓ Centrifuger les colonnes à 10000 tours pendant une minute à température ambiante.
- ✓ Jeter les conteneurs et on mettre dans un nouveau conteneur.
- ✓ Ajouter 500µl de wash buffer 1 dans les colonnes.
- ✓ Centrifuger a 10000 tours pendant 1 min à température ambiante
- ✓ Jeter les conteneurs et remettre de nouveau.
- ✓ Additionner 500µl de wach buffer 2.
- ✓ Centrifuger a 15000 tours pendant 3 min à température ambiante.
- ✓ Jeter le collecteur et transférer la colonne dans des tube de 1.5ml.
- ✓ Ajouter 50µl de genomic elution buffer dans la colonne.
- ✓ Centrifuger a 15000 tours pendant 1 min à température ambiante.
- ✓ Rajouter 50µl de genomic elution buffer.
- ✓ Jeter la colonne.
- ✓ Centrifuger à 15000 pendant 1min30 à température ambiante.
- ✓ Conserve l'ADN à +4°C.

Solution	Quantité
Genomic degesta buffer	180µL
Protéinase k	20µL
Genomiclysis buffer	200µL
Ethanol absolue	200µL
Wash buffer 1	500µL
Wash buffer 2	500µL
Genomic elution buffer	50µL

Tableau 11 : les solutions utilisées

7-3- Préparation du mix

Pour tous les gènes caractérisés, le mix de la réaction est de 25 µl, inclus 10×PCR buffer, 25mM Mgcl₂, 10µM dNTP Mix, 10µmol de chacune des deux amorces, et 5U/µl d'ampli *taq* gold.

Réactifs	Quantité
PCR buffer ×10	10µL
Dntp mix10mM	2µL
Mgcl2 25mM	4µL
Forward primer 10µmol	2µL
Reverse primer10µmol	2µL
Ampli taq gold 5u/µL	0.5µL
H2O	79.5µL

Tableau 12 : Mix pour 4 souches (pour un volume final de 25 microlitres)

7-4- Préparation de gel d'agarose de 1,5%

Mélanger 3 gramme de poudre d'agarose dans 200 ml de TBE*10 (TRIS Borate EDTA), puis faire fondre dans un microonde jusqu'à la fusion totale du gel, enfin ajouter 10µL de bromure d'éthidium (précaution lors d'utilisation). Ensuite couler la solution dans le moule , Et laisser refroidir.

8- Amplification des gènes

8-1- Gène de coagulase

-) Mettre 23µl du mix PCR et 2µl d'ADN de souche à tester.
-) Amplifier dans le thermocycleur selon les paramètres suivants :

Dénaturation initial : 95°C /10min.

Dénaturation : 94°C /40sec.

Hybridation : 59°C /1min.

Elongation: 72°C /1min.

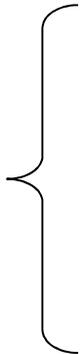
Extension finale : 72°C /10min

-) Effectuer une migration avec 10µl du produit PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.5% à 90 v pendant 45 min.
-) Lecture des résultats sous UV.

8-2- Gène de thermonucléase :

-) Mettre 23µl du mix PCR et 2µl d'ADN de souche à tester.
-) Amplifier dans le thermocycleur selon les paramètres suivants :

Dénaturation initial : 95°C /10min.



Dénaturation : 94°C /1min.
Hybridation: 61°C /30sec.
Elongation : 72°C /1min.

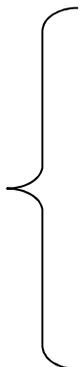
Extension finale : 72°C / 10min.

-) Effectuer une migration avec 10µl du produit PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.5% à 90 v pendant 30 min.
-) Lecture des résultats sous UV.

8-3- Gene de l'entérotoxine A

-) Mettre 23µl du mix PCR et 2µl d'ADN de souche à tester.
-) Amplifier dans le thermocycleur selon les paramètres suivant :

Dénaturation initial : 95°C /10min.



Dénaturation : 94°C /2min.
Hybridation : 56°C /30sec.
Elongation : 72°C /45sec.

Extension finale : 72°C /10min

-) Effectuer une migration avec 10µl du produit PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.5% à 90 v pendant 30 min.
-) Lecture des résultats sous UV.

Résultats et discussion

Résultats et discussion

1-Prélèvements

Durant la période de novembre 2016 à juin 2017. 130 prélèvements d'aliments de restauration ont été analysés au laboratoire de bactériologie des eaux et des aliments à l'institut Pasteur d'Algérie.

Les prélèvements sont présentés dans le tableau suivant :

Type de prélèvement	Nombre de prélèvement	Pourcentage
Plats cuisinés à base de légumes	57	44%
Plats cuisinés à base de viande	35	27%
Pâtisserie et crème pâtissière	15	12%
Pâtes	11	8%
Divers	12	9%

Tableau 13 : nombre et pourcentage des prélèvements

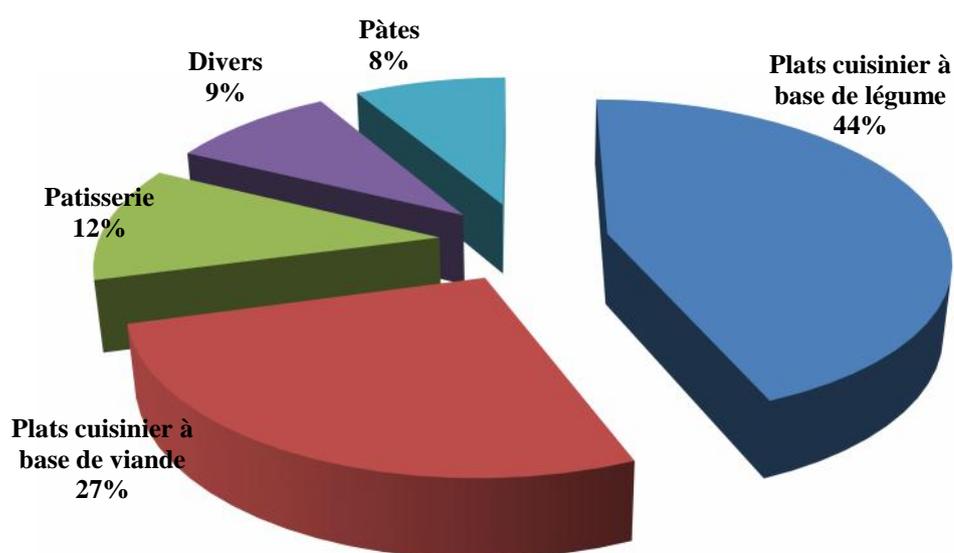


Figure 07 : pourcentage des types d'aliments prélevé

2- Isolement des staphylocoques à coagulase positive

2-1- Culture des prélèvements

Parmi 130 cultures, 84 ont poussées sur Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium soit un taux de 64,61%.

Parmi 84 cultures poussées sur Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium, 47 cultures sont des colonies caractéristiques soit un taux de 36,15% et 37 étaient des colonies non caractéristiques.

-Mode d'action de milieu Baird Parker :

Le tellurite de potassium réduit en tellure métallique noir par les staphylocoques, produit des colonies noires. Le jaune d'œuf contient des lipoprotéines qui peuvent être hydrolysées par des lipoprotéinases en produisant un halo d'éclaircissement au jaune d'œuf autour de la colonie, après 48 heures d'incubation une opacification peut apparaitre dont l'halo traduisant l'action d'une lécithinase. (Delarras Camille 2007)

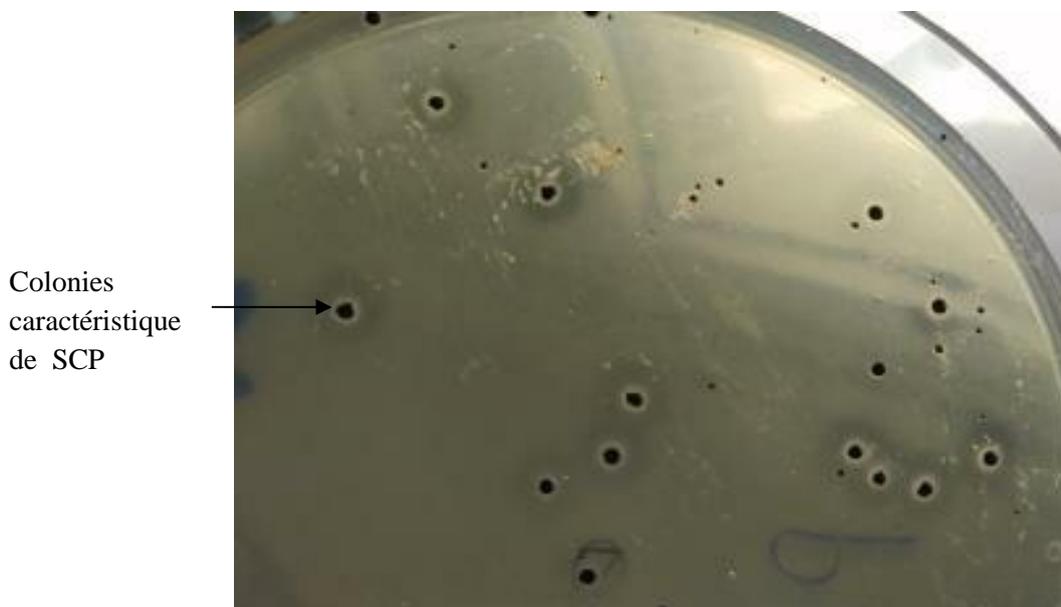


Figure 08 : Aspect des colonies caractéristiques de staphylocoque à coagulase positive sur milieu Baird Parker.

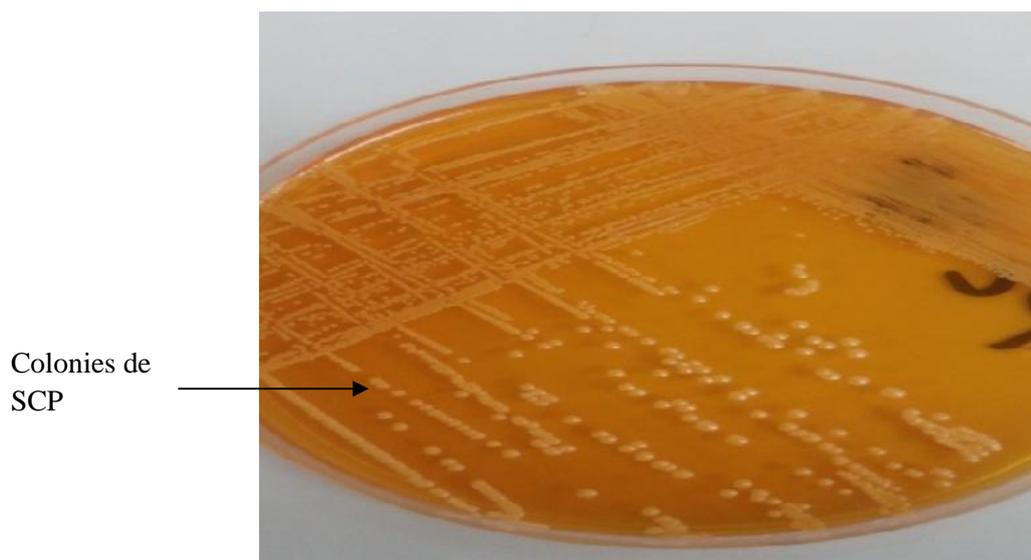


Figure 09 : Aspect des colonies de staphylocoque à coagulase positive sur milieu Chapman.

3- Identification et dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Sur les 84 cultures poussées sur Baird Parker au jaune d’œuf et au tellurite de potassium, 38 souches sont positives au test de la coagulase (utilisation de plasma de lapin lyophilisé) (**institut pasteur d’Algérie**), soit un taux de 29,23% de staphylocoques à coagulase positive, et 46 souches étaient des staphylocoques à coagulase négative soit un pourcentage de 35,38%.

Considérer que la réaction à la coagulase est positive, quand le coagulum occupe plus de la moitié du volume initialement occupé par le liquide.

Prélèvement	Culture positive	Staphylocoque à coagulase positive	Staphylocoque à coagulase négative
130	84	38	46
100%	64,61%	29,23%	35,38%

Tableau 14 : prévalence des staphylocoques à coagulase positive et négative.

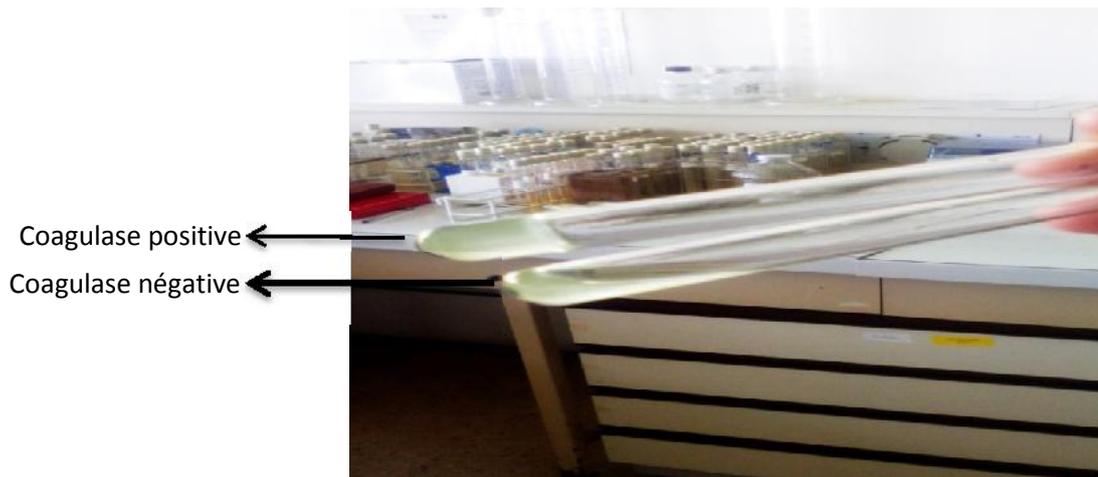


Figure 10 : mise en évidence de la coagulase

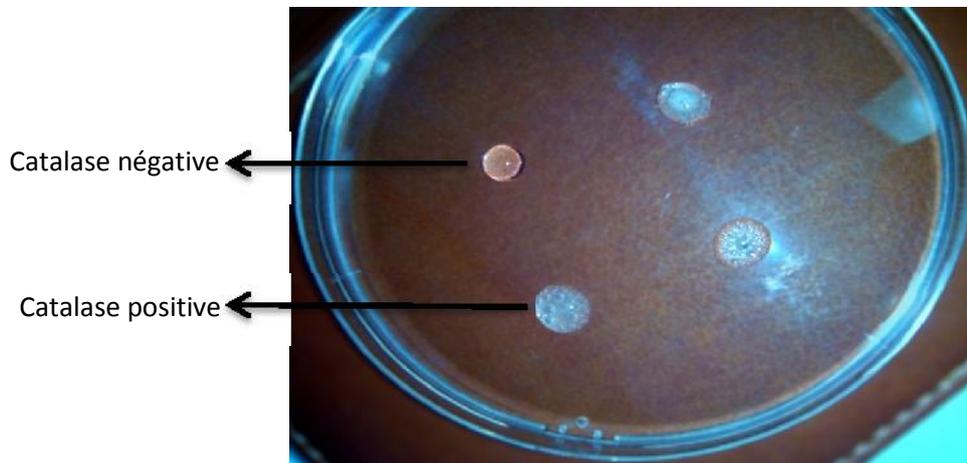


Figure 11 : mise en évidence de la catalase

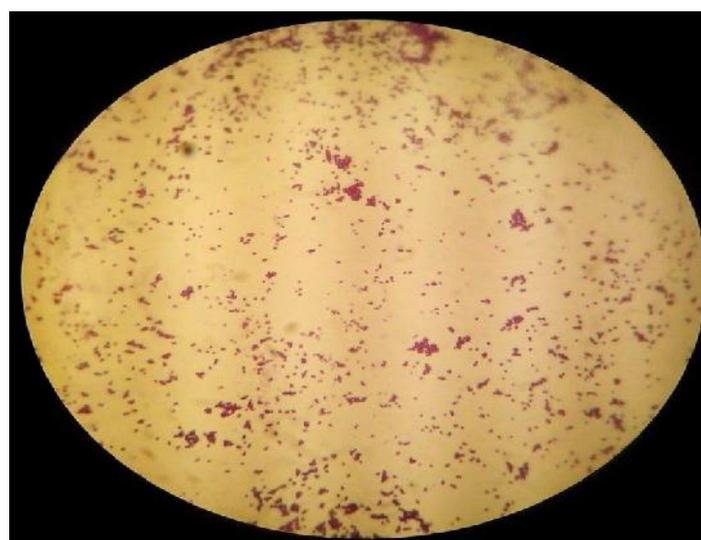


Figure 12: aspect microscopique des staphylocoques a coagulase positive
(coloration de gram G X100)

3-1- La qualité bactériologique des prélèvements

La qualité bactériologique des aliments par rapport aux staphylocoques à coagulase positive est évaluée par un dénombrement des staphylocoques à coagulase positive comparés aux critères requis par l'arrêté interministériel N° 35-1998 du 24 janvier 1998.

Sur un total de 130 prélèvements, 21 sont non conformes à la législation, soit un taux de 16,15% sur tous les prélèvements, et un pourcentage de 46,66% sur les prélèvements contaminés.

Qualité	Inférieur à 3m satisfaisante	Entre 3 m et 10 m acceptable	Supérieur à M non satisfaisants
Nombre d'échantillons	103	06	21
Pourcentage d'échantillons	79,23%	4,61%	16,15%

Tableau15 : prévalence des aliments conforme et non conforme à la législation (**m**: seuil au-dessous duquel le produit est considéré comme étant de qualité satisfaisante.. **M**: seuil limite d'acceptabilité au-delà duquel les résultats nesont plus considérés comme satisfaisants)

3-2-Répartition des staphylocoques à coagulase positive selon les prélèvements

Durant cette étude nous avons isolé 38 souches de staphylocoques à coagulase positive, soit une prévalence de 29,23% sur l'ensemble des prélèvements analysés. Avec des fréquences élevées dans le secteur pâtisserie 93,33%, suivis par les divers avec 33,33% et les plats à base de viandes 25% comparés aux autres aliments de restauration analysé.

Types d'aliments	Nombre de prélèvement	Nombre de staphylocoque à coagulase positive	Pourcentage de staphylocoque à coagulase positive
Plats cuisinés à base de légumes	57	10	17,57%
Plats cuisinés à base de viande	35	09	25,71%
Pâtisseries et crème pâtissière	15	14	93,33%
Pâtes	11	01	10%
Divers	12	04	33,33%

Tableau 16: Prévalence des staphylocoques à coagulase positive selon les prélèvements.

La contamination des aliments par des staphylocoques à coagulase positive est due à la manipulation et au non-respect des règles d'hygiène. Le taux élevés des staphylocoques à coagulase positive dans la catégorie pâtisserie et crème pâtissière peut être due aux différents ingrédients utilisés (le lait) (Narmanno et al., 2005), ou à des contaminations dues à la manipulation et à la non cuisson de certaines crèmes.

Les résultats de notre étude sur la répartition des staphylocoques à coagulase positive sont de fréquences moins élevées par rapport aux autres travaux, elle est de 62% dans l'étude de Sokari, 1991 dans les aliments prêts à manger au Nigeria, de 39,9% dans l'étude de Lina Casale et al., 2007 au Brésil, et de 36,5% dans celle de Senait, 2016 En Éthiopie.

les études réalisées par Normano et al., 2007 (Italie); Kim et al., 2001 (Corée) ont rapportés des pourcentage inférieurs comparativement à notre étude, avec des taux respectifs de 17,3% et 5,98% dans les aliments prêts à manger. Cependant Su kyung oh et al., ont trouvé 8,6% des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments prêt à manger avec un pourcentage élevé dans les crèmes pâtissière qui était de 31,6%.

Depuis que les aliments comme les kebabs et les hamburgers ont envahis nos tables et qui ont beaucoup de contact avec les mains pendant leurs préparations, il est plus susceptible que la température de cuisson ne soit pas suffisante pour inhiber toute contamination vu que les températures de cuisson normale ne détruisent pas les toxines (Aycicek et al., 2005).

La différence des résultats d'isolements des staphylococcus à coagulase positive entre les pays est due aux cultures culinaires différentes et au respect de règle d'hygiène.

4- Caractérisation moléculaires des gènes de virulence par PCR

Toutes les cultures avec des colonies caractéristiques sur Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium sont soumises à la PCR

4-1- Electrophorèse de l'ADN extrait

L'électrophorèse de l'ADN extrait a pour but de vérifier l'efficacité du protocole d'extraction et la qualité d'ADN extraite.

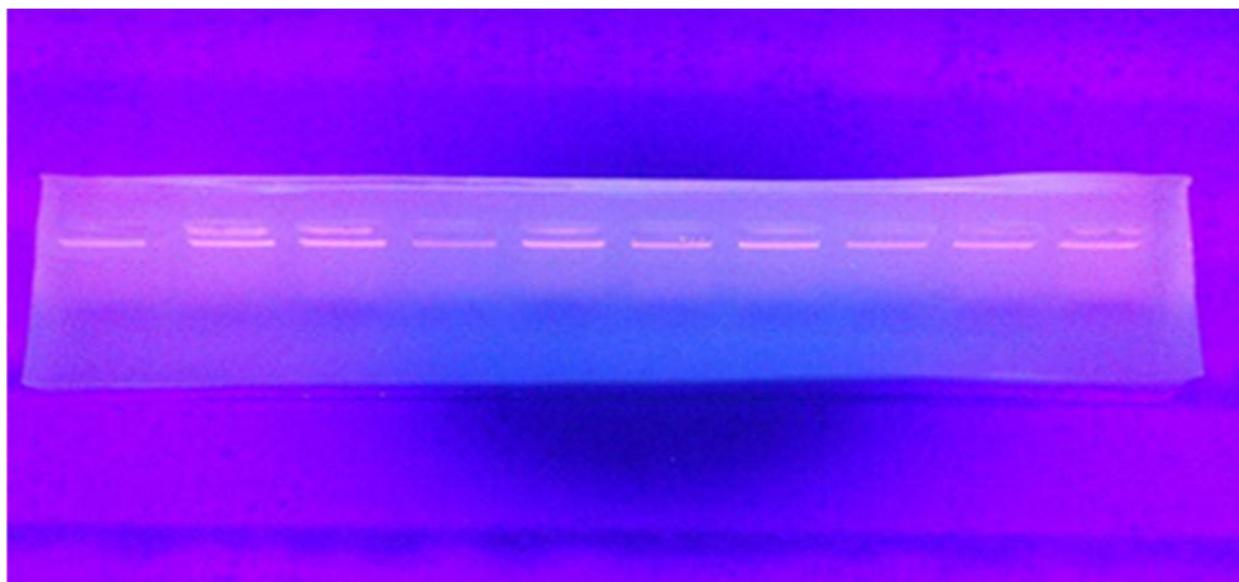


Figure 13 : Electrophorèse d'ADN extrait

Cette électrophorèse révèle des bandes uniques avec absence de smear ce qui veut dire que l'ADN extrait n'est pas contaminé.

4-2-Facteur de virulence la Coagulase (*coa*)

L'amplification de gène de coagulase a donné des amplicans à 627bp et 710bp.

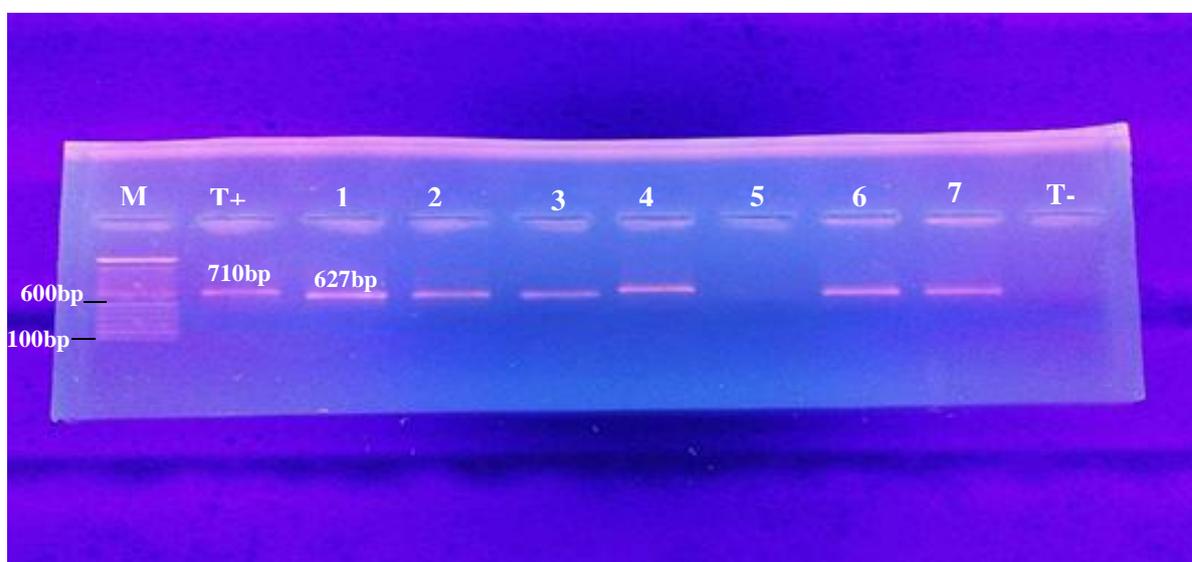


Figure 14 : résultat d'amplification de gène de coagulase

M : poids moléculaire de 100bp. T+ : témoin positive. T- : témoin négative

Le gène codant pour la coagulase est détecté dans 38 souches soit une fréquence de 29,23% ce qui est similaire au test de coagulase sur tube, et de 81% sur les souches caractéristiques.

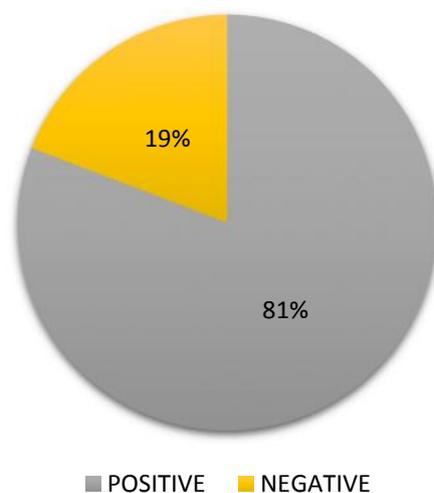


Figure 15: pourcentage du gène de la coagulase.

Le gène de coagulase de staphylococcus aureus est considéré comme un important facteur de virulence (A. Hussain et al., 2016). L'amplification du gène de la coagulase de *S.aureus* a été recommandée comme méthode précise pour l'identification des souches virulentes de *S.aureus* (Morandi, S et al., 2010). La caractérisation du gène de la coagulase par PCR a révélé un polymorphisme de gène a 627bp et 710bp, nos résultats concordent avec les travaux de plusieurs auteurs sur l'étude de ce gène (Dewanand Rajaram Kalorey et al., 2007 Seyed Mostafa Hosseini et al., 2016. Vishnu Sharma et al., 2017) ce qui explique la variété génétique des souches de staphylocoques à coagluase positive isolées.

la variabilité de la région terminal 3 du gène de la coagulase sert de base à une méthode génotypique employée pour des isolats des humains infectés (Montesinos I et al., 2002) et des animaux (Lange et al., 1999). Par cette méthode, nous avons détecté beaucoup de différents génotypes parmi les isolats étudiés, qui suggère que *S.aureus* a une considérable hétérogénéité dans la région prélevée (Elizabete Rodrigues da Silva et al., 2007) la présence de peu de types peut permettre une plus grande efficacité dans les mesures de contrôle de *S.aureus* puisque les facteurs importants de virulence pourraient être spécifiquement visés. En outre, ces chercheurs ont démontré que les organismes avec les génotypes prédominants de coagulase étaient plus résistants aux activités de neutrophile que ceux avec les génotypes rares (Su C et al., 1999). La classification de *S.aureus* isolé basée sur le gène de coagulase a été

considérée comme une méthode simple et précise pour la génotypique moléculaire (Rodrigues da Silva et al., 2005).

Mohammad Mehdi Soltan et al., (2016) ont prouvé que toute fois des échantillons alimentaires ont été contaminé par *S.aureus* hébergeant plus d'un génotype de coagulase, seulement quelques génotypes de *coa* étaient prédominés. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les caractéristiques communes de prédominance. Cette information peut être employée pour développer mieux les mesures de contrôle pour les aliments contaminé par *S.aureus*. (Mohammad Mehdi Soltan et al., 2016). Cette distribution pourrait être expliquée par le coévolution, des hôtes et les agents pathogènes, ainsi que par les différences dans les réservoirs et impliquer que le transfert réussi des bactéries entre le lait de vache de mammite, la viande crue et les légumes n'est pas un cas fréquent (O. Aslantas, C et al., 2006 ; Hennekinne et al., 2012).

4-3-Facteur de virulence la Nuclease (*nuc*)

L'amplification du gène de *nuc* a produit un amplicon à 270bp.

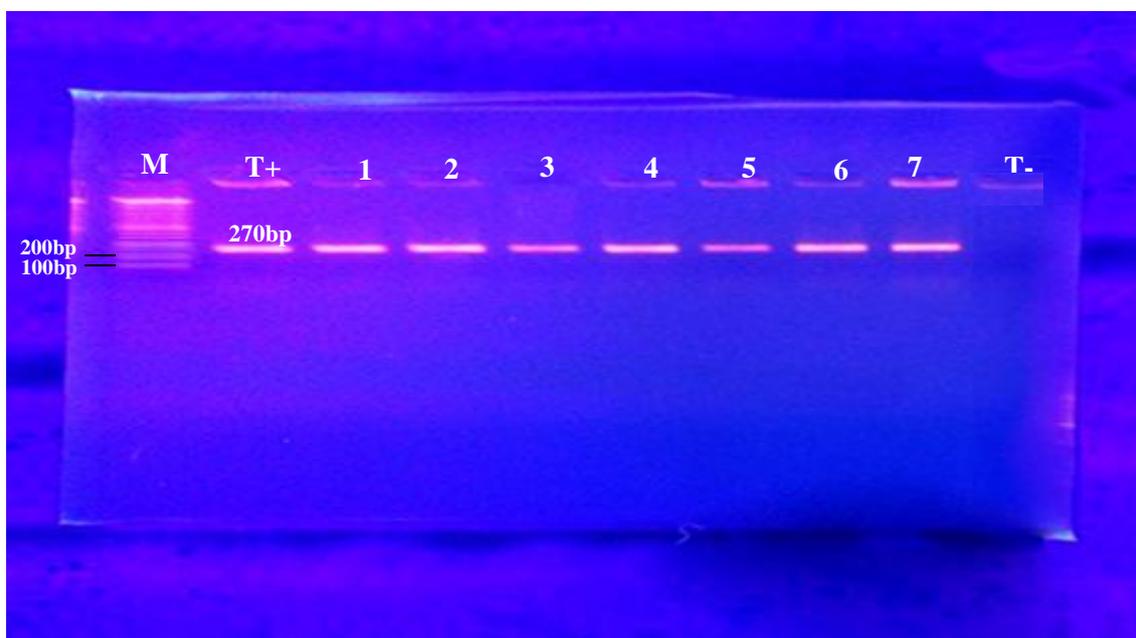


Figure 16 : résultats d'amplification de gène de nucléase

M : poids moléculaire de 100 bp - T+ ; témoin positive. - T- : témoin négative.

Au terme de notre étude, le gène codant pour la nucléase a été détecté dans 43 souches soit un pourcentage de 91% sur les souches caractéristiques dont 36 souches à coagulase positive et 07 souches à coagulase négative.

Le gène nucléase est spécifique pour *staphylococcus aureus* donc on l'a utilisé pour l'identification rapide de ce germe. On a identifié 43 souches de *Staphylococcus aureus* soit un pourcentage de 91% par rapport aux isolats caractéristiques et de 34,61% sur tous les prélèvements

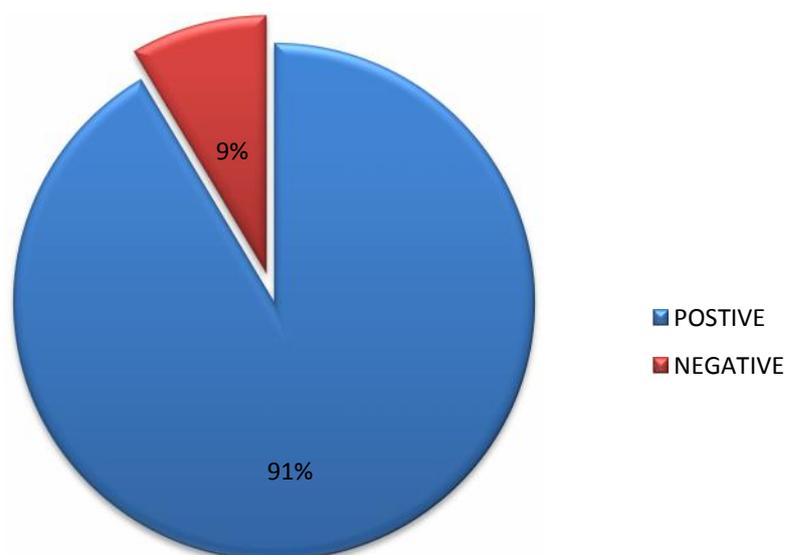


Figure17 : pourcentage du gène de la nucléase.

Un produit de PCR de taille de 270bp est avéré spécifique pour cet organisme. Cette méthode a été depuis employée par de divers travailleurs pour la confirmation génotype de *S.aureus* de différentes sources (**Gindonis et al., 2013**).

L'amplification PCR du gène de nuc a été employée comme un standard d'or pour la détection de *S.aureus* dans beaucoup d'études (**Hein et al., 2001, Alarcón et al., 2006, Esan et al., 2009**). Des amorces spécifiques de PCR pour la détection de *S.aureus* ont été dirigées vers le gène *nuc* codant la nucléase thermostable (**Brakstad et al., 1992 ; Hein et al., 2001 ; Palomareset et al., 2003**).

Les souches de *S.aureus* ne sont pas thermostables mais leurs entérotoxines sont résistantes à la chaleur. La détection du gène de *nuc* par la méthode PCR peut être utilisée pour déterminer la présence des bactéries toxigènes concernant la stabilité à la chaleur des toxines (**Hein et al., 2001**), vu que les essais biochimiques ne sont pas assez pour l'identification fiable de *S.aureus*. Il était également rapporté qu'il n'y a aucun essai qui peut identifier avec certitude *S.aureus* (**Kateete et al., 2010**).

Le gène nucléase est spécifique pour *Staphylococcus aureus*, d'où son utilisation pour l'identification rapide de ce pathogène. On a recensé 43 souches de *Staphylococcus aureus* soit un pourcentage de 34,61%. Nos résultats concordent avec les travaux de **Xiaonan xing et al.**, avec un pourcentage de 37% de souches identifiés par le gène de *nuc* par PCR dans les aliments prêt a mangé en chine. Cependant ce taux est significativement supérieur à celui déclaré par **Seyed Mostafa Hosseini et al.**, dans leur étude en Iran avec une prévalence de 9,33% confirmé toujours via le gène nucléase.

Basé sur le fait que la contamination des aliments avec *S.aureus* peut se faire à la source de la production alimentaire, pendant le traitement et la préparation des produits, le transport et le stockage (**Bennett et al., 2013**), Beatriz Pinto et al., ont proposé dans leurs étude que la caractérisation de gène de nucléase par PCR comme technique rapide et précieuse qui peut être appliqué directement au colonies simple cultivé dans des milieux spécifique, pour une identification claire et précise. L'identification génotypique par amplification de gène nucléase par PCR n'est pas en concordance avec l'identification phénotypique (coloration de gram, catalase et coagulase); puisque 07 colonies caractéristiques sur milieu Baird Parker au jaune d'œuf qui sont négative au test de coagulase sur tube et sur PCR étaient positives au gène de nucléase donc on les classes comme *staphylococcus aureus* mutant qui ont perdu leurs gènes de coagulase suite à un quelconque fait génétique.

Cependant, Pereira et al., (2008) ont trouvé une concordance entre l'identification génotypique par amplification de gène de nucléase et l'identification phénotypique(coloration de gram, catalase, et coagulase) dans différents aliments (**Pereira et al.,2008**).

Prélèvements	<i>Staphylococcus aureus</i>	Staphylocoques a coagulase positive non aureus
130	43	02
100%	34,61%	1,53%

Tableau 17 : prévalence des *Staphylococcus aureus*.

Durant notre enquête, Sur 47 souches isolés comme colonie caractéristique sur milieu Baird Parker, 43 souches d'entre elles sont des *staphylococcus aureus* soit une fréquence de 91%, et 2 souches sont des staphylocoques à coagulase positive non aureus, ce qui confirme leurs rareté dans les aliments (De Buyser 2008). La présence de *S.aureus* dans les aliments constitue un risque significative et peut être utiliser comme une indication de contamination croisée (Aycicek et al., 2005).

Les principaux réservoirs de *S.aureus* sont les fosses nasales et la peau humaine. Les manipulateurs d'aliments sont la source primaire de contamination des nourritures. Quand un aliment est exposé à la manipulation humaine, les manipulateurs asymptomatiques peuvent héberger *S.aureus* et peuvent souiller la nourriture pendant la préparation. En estime qu'en moins 30 à 50% des personnes portent ces microorganismes dans leurs fosses nasales et gorges, ou sur les mains. Les manipulateurs d'aliments devraient pratiquer une bonne condition d'hygiène personnelle et aussi devraient être instruits sur la manipulation pratique des aliments (Cliver et al., 2002). Cogan et al., (2002) dans leurs recherche ont mis au jours que les hôtes de *S.aureus* sont les manipulateurs d'aliments (Cogan et al., 2002) particulièrement aux secteurs nasaux et les mains qui est le véhicule de *S.aureus* entérotoxigène par des manipulateurs d'aliments qui sont la source importante de contamination des aliments en restaurants et cantine (Colombari et al., 2007).

Types d'aliments	Nombre de prélèvements	Nombre de staphylocoque aureus	Pourcentage de staphylococcus aureus
plats à base de légumes	57	12	21%
plats à base de viande	35	11	31,42%
Pâtisseries et crème pâtissières	15	14	93,33%
pâtes	11	02	18,18%
Divers	12	04	33,33%

Tableau 18 : prévalence de *Staphylococcus aureus* par type d'aliments.

L'étude de la prévalence des aliments contaminés par *S.aureus* durant cette étude a permis de mettre en premier plant les aliments les plus contaminés et qui sont :les pâtisseries et crème pâtissière avec une prévalence de 93,33% ; due à leurs légère, ou non cuisson et aussi aux fréquences de manipulation et de touchés dans ce

secteur, et au condition de stockage des crèmes. Suivie par les plats à base de viande en second plan avec une fréquence de 31,42% due à l'habilité de la viande à la contamination rapide avant ou après cuisson, et au forte demande des plats dans la restauration collective surtout dans la région d'Alger ce qui conduit à une négligence d'hygiène par les manipulateurs .

4-4-Facteur de virulence entérotoxine A (SEA)

L'amplification de gène de l'entérotoxine a produit un amplicons à 216 bp.

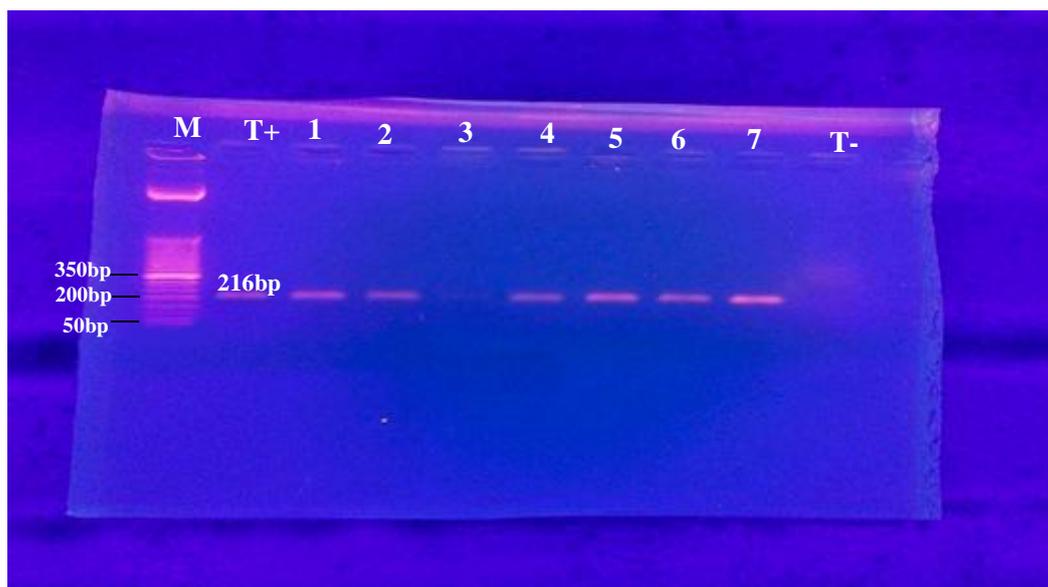


Figure 18 : resultat d'amplification de gene d'enterotoxine A
M : poids moléculaire de 50 bp. T+ ; témoin positive. T- : témoin négative

Les analyses statistiques sur la prévalence du gène entérotoxine A ont révélés que 13 souches étaient positives au gène de SEA soit une fréquence de 10% sur tous les prélèvements, 27,6% par rapport aux souches caractéristiques et 30,23% par rapport aux *Staphylococcus aureus* isolés.

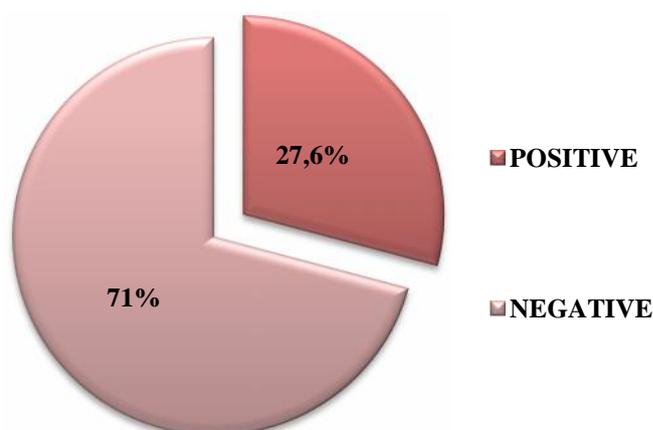


Figure 19: pourcentage de gène d'enterotoxine A

D'après les résultats qu'on a eu durant ce travail, l'entérotoxine A est détectée beaucoup plus dans les pâtisseries avec une fréquence de 78,57%, et une fréquence dans 2 divers aliments qui préviennent des toxi-infections alimentaires déclarées. Les souches enterotoxigènes détectées possèdent le gène de nucléase et de coagulase

En Algérie les aliments les plus impliqués dans les toxi infections alimentaires sont les plats variés (**ministère du commerce. 2017**) Au Japon les aliments les plus impliqués dans les toxi infections alimentaires sont les aliments de culture culinaire japonaise composés de riz, boule de riz, frites, sushi et des repas qui contiennent de multi ingrédients (**Shimizu et al., 2000**). En Corée du sud les aliments les plus impliqués sont les viandes et les fruits de mer pas assez cuits et les aliments de multi ingrédients (**Su kyung oh et al., 2007**). Su kyung oh et al., ont rapporté que la majorité des aliments contaminés par *S.aureus* toxigène sont des garnitures et des gâteaux de riz avec 92% de souches productrices d'entérotoxine A (**Su kyung oh et al., 2007**).

L'entérotoxine A est l'entérotoxine la plus souvent trouvée, parmi 31 manifestations d'intoxication alimentaire staphylococcique en France (69,7%), qui ont été associées à une grande variété d'aliments comprenant les produits laitiers, différents types de viandes, et salades, entre 1981 et 2002 (**Kérouanton et al., 2007**). En 2007 à l'Autriche, une manifestation d'intoxication alimentaire

staphylococcique a affecté 40 enfants qui a été attribués aux isolats de *S.aureus* produisant l'entérotoxine A et l'entérotoxine D (Schmid et al., 2007)..

Des produits laitiers bovins ont été identifiés comme source de manifestation, et les vaches étaient le réservoir le plus probable des *S.aureus* producteur d'entérotoxine (Schmid et al., 2007).

Plusieurs études ont investigué la distribution des entérotoxines et de leurs gènes dans les staphylococcus aureus isolé à partir des aliments et des manifestations d'intoxication alimentaire staphylococcique dans les pays asiatiques. Parmi les souches récupérées des patients liés aux manifestations d'intoxication alimentaire staphylococcique pendant 2001-2003 à Taïwan, l'entérotoxine A était le gène le plus commun. (Chiang YC et al., 2008)

L'entérotoxine A et l'entérotoxine D sont le plus souvent lié à l'intoxication alimentaire (Portocarrero et al., 2002).

Les entérotoxine A sont devenues toxiques dans de bas concentration 0,6 ng/ml, donc la recherche de souche de *S.aureus* qui exprime ce gène est important (Holeckova Bet al., 2002).

Au cours de notre étude les souches entérotoxigène de *S.aureus* ont été incriminé lors de toxi infection alimentaires collectives avec des seuil minimal de détection (dénombrement à partir de 10⁵ufc/g) ce qui ne se collabore pas avec d'autres études ou les limites ont été fixé à 10⁵ et 10⁶ (seuil limite de dénombrement de *S.aureus* pour provoquer des toxi-infections alimentaires) (Min, K et al., 2013) (Hennekinne et al., 2012) cela peut être expliquer par le fait que ces TIAC représentent un danger plus important pour des population a risque tels que la classe YOPI (enfant, vieux , femme enceinte et personne immunodéprimé) qui peut être sensible à des concentrations faibles de *S.aureus* enterotoxinogène

Conclusion

Conclusion

Face à l'absence d'études épidémiologiques concernant la recherche des staphylocoques à coagulase positive et la caractérisation moléculaire des facteurs de virulence dans les restaurations collective en Algérie, nous avons axé notre travail sur l'identification de ce pathogène impliqué dans les toxi-infections alimentaires, de voir la qualité bactériologique des aliments de restauration par rapport à ce germe et de caractériser les gènes de virulences *coagulase*, *nucléase*, et *entérotoxine A* par la méthode PCR en identifiant *S.aureus* avec le gène spécifique nucléase.

Cette recherche nous a permis de constater un taux élevé des staphylocoques à coagulase positive avec une prévalence alarmante dans les pâtisseries et crème pâtissière qui peut provoquer des intoxications alimentaires.

La méthode PCR nous a permis de détecter spécifiquement *S.aureus* avec une prévalence de 34,61%, et qui a aussi révélé que 07 souches étaient coagulase négatives avec les tests phénotypique et au gène de coagulase, par contre elles sont nucléase positives donc considérées comme *S.aureus*, d'où l'importance d'introduire cette méthode dans les laboratoires de contrôle qualité pour assurer un bon diagnostic avec une précision de détection, et de caractériser les souches virulentes. Ces méthodes PCR nous ont permis aussi de détecter des souches entérotoxigènes pour la première fois en Algérie.

Par ailleurs, cette étude a démontré l'importance et l'impact du pathogène *S.aureus* dans la filiale alimentaire, et le potentiel de l'amplification du gène nucléase pour l'identification rapide de ce pathogène dans les aliments.

La réglementation algérienne a mis des seuils de limite pour le dénombrement de ce pathogène, et impose la mise en place de mesures basées sur les bonnes pratiques d'hygiène, l'appréciation des dangers, et la réalisation de contrôles pour vérifier la conformité des aliments. mais cela reste insuffisant suite à la réémergence de nouvelle souche plus virulente et plus pathogène a l'origine des intoxications alimentaire même avec un seuil minimum de dénombrement.

L'évaluation des taux des staphylocoques à coagulase positive particulièrement le *Staphylococcus aureus* dans les restaurations collective vas nous permettre de connaitre les conditions d'hygiènes afin de les améliorées et d'établir

un plan de surveillance et de lutte contre les toxi-infections alimentaire collective, surtout avec la présence de souche entérotoxigènes dans nos aliments qui constitue un grand risque pour le consommateur.

A la lumière des résultats de cette étude, on pense que La situation est préoccupante, ce qui envisage des perspectives de :

-) Faire plus d'étude épidémiologique avec un nombre d'échantillonnage plus important pour mieux cerner ce germe.
-) Chercher et de mettre en évidence d'autres entérotoxines.
-) Mettre en évidence la quantité d'entérotoxine présente dans les aliments.
-) Introduire les techniques PCR comme test de routine dans les laboratoires de contrôle qualité.
-) Définir des plans d'hygiène et de surveillance applicable pour la restauration collective.
-) Mettre en place un système d'analyse des risque sanitaire liée au denrée alimentaires , et donc une gestion des risques qui passe par la compréhension de la nature du danger, et des points de contrôle critiques auxquels le nécessaire doit être fait pour garantir que les aliments ne soient pas contaminés par des microorganismes pathogènes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. **A,Hussain, M. 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 The Journal of Animal & Plant Sciences, 26(2): 2016, Page: 408-414
2. **Alarcón, B.,Vicedo, B., Aznar, R.** (2006) PCR-based procedures for detection and quantification of Staphylococcus aureus and their application in food. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 100, 352364.
3. **Alarcón, B., Vicedo, B., Aznar, R. (2006).** PCR-based procedures for detection and quantification of Staphylococcus aureus and their application in food. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 100, 352-364.
4. **Alomar Jomaa.2007.** Etude des propriétés physiologiques de Lactococcus lactis et Lactococcus garvieae pour la maîtrise de Staphylococcus aureus en technologie fromagère. Thèse de doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut national polytechnique de lorraine-Nancy, France.
5. **Arrêté interministériel du 25 Ramadhan 1418 correspondant au 24 janvier 1998** modifiant et complétant l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires
6. **Arrêté du 21 Rajab 1435 correspondant au 21 Mai 2014** rendant obligatoire la méthode de dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (staphylococcus aureus et autres espèces)
7. **Arora P, Sindhu A, Kaur H,** An overview of transducers as platform for the rapid detection of foodborne pathogens. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97 (5):1829-1840.
8. **Asao T., Kumeda Y., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. 2003.** An extensive outbreak of SEP due to low-fat milk in Japan : estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. J. Epidemiol. Infect 130, 33-40.
9. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F. and Monteil H. (2003).** Bactériologie clinique. 3eme édition. Ellipses, Paris. 8-28.
10. **Avril J.L., Dabernat H., Denis F., Monteil H. 1992.** Bactériologie Clinique. 2 nd Edition, Ellipses, Paris.
11. **Aycicek H, Cakiroglu S, Stevenson TH.** Incidence of Staphylococcus aureus in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara,Turkey. Food Control. 2005; **16** (6):531–4.

12. **Baba T., Takeuchi F. and Kuroda M. (2002).** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet.* **359:** 1819-1827.
13. **Balaban N, Rasooly A.** Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol.* 2000 ;61 : 1-10.
14. **Bendahou A., Abid M., Bouteldoun N., Catelejine D., Lebbadi M. 2009.** Enterotoxigenic coagulase positive staphylococcus in milk and milk products, Iben and jben, in northern Morocco. *J. Infect. Developing Countries*3(3), 169-176.
15. **Bennett SD, Walsh KA, Gould LH (2013)** Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus*—United States, 1998–2008. *Clin Infect Dis* 57(3):425–433.
16. **Bergdoll, M.S., 1979.** Staphylococcal intoxications. In: Riemann H, Bryan FL. Food-borne infections and intoxications. Academic press New York, 443-494.
17. **Betley M. J. et Mekalanos J. (1988).** Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol* **170** (1), 34-41.
18. **Beatriz Pintoa,b,Empar Chenolla,b, Rosa Aznara,** Identification and typing of food-borne *Staphylococcus aureus* by PCR-based techniques., *Systematic and Applied Microbiology* 28 (2005) 340–352.
19. **Blaiotti G., Pennacchia C., Villani F., Ricciardi A., Tofalo R. and Parente E. 2004.** Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausage. *J. of applied Microbiology* 97, 271-284.
20. **Balaban, N., Rasooly, A.,** Staphylococcal enterotoxins, *Int. J. Food Microbiol.* 61 (2000) 1–10
21. **Borst D. W. et Betley M. J. (1994).** Phage-associated differences in staphylococcal enterotoxin A gene (sea) expression correlate with sea allele class. *Infect Immun* **62** (1), 1138.
22. **Brakstad, O.G., Aasbakk,K. and Maeland, J.A.,** Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene, *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 30, pp. 1654-1660, 1992.
23. **Bronner S., Monteil H. and Prevost G. (2004).** Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. *FEMS Microbiol Rev.* **28:** 183-200.
24. **C.Palomares,M.J. Torres,A. Torres,J. Aznar,J.C. Palomares,** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45 (2003) 183–189.

25. **Chiang YC, Liao WW, Fan CM, Pai WY, Chiou CS, Tsen HY** PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan *Int J Food Microbiol.* 2008 Jan 15; 121(1):66-73.
26. **Cogan, T. A., Slader, J., Bloomfield, S.F. and Humphrey, J.** 2002. Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology* 92: 885–892.
27. **Colombari, V., Mayer, M. D. B. and Laicini, Z. M.** 2007. Foodborne outbreak caused by *Staphylococcus aureus*: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *Journal of Food Protection* 70: 489–49.
28. **Corne philippe. (2004)-** *Staphylococcus aureus* dans un service de réanimation : étude génétique, phénotypique et épidémiologique. Thèse de doctorat, Montpellier I, p.18
29. **Cremonesi, P., Luzzana, M., Brasca, M., Morandi, S., Lodi, R., Vimercati, C., Agnellini D., Caramenti, G., Moroni, P., Castiglioni, B. (2005).** Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. *Molecular and Cellular Probes*, 19, 299–305.
30. **Delarras Camille, 2014,** *Pratique en microbiologie de laboratoire : recherche de bactérie de levures et moisissures.*
31. **Delarras Camille 2007,** *microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.*
32. **Dewanand Rajaram Kalorey, Yuvaraj Shanmuga, Nitin Vasantrao Kurkure, Kapil Kamalakar Rao Chousalkar , , Sukhadeo Baliram Barbuddhe** PCR-based detection of genes encoding virulence determinants in *Staphylococcus aureus* from bovine subclinical mastitis cases *J. Vet. Sci.* (2007), 8 (2), 151–154.
33. **Di Giannatale E., Vincenza P., Alfreda T., Cristina M., Giacomo M. 2011.** Characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food human consumption. *Veterinaria Italiana*, 47(2), 165-173.
34. **Di Maio, M.** 2009. Bacterial meningitis as a complication of central nervous system malformations. *Med Mal Infect.* 39: 560-561.
35. **Dinges M.M., Orwin P.M., Schlievert P.M 2000.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 16-34.
36. **Dufour P., Gillet Y. and Bes M. et al. (2002).** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in France: emergence of a single clone that produces Pantone-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis.* 35: 819-824.

37. **Dumitrescu. O., Dauwaldera. O., Gilleta. Y., Vandenesha. F., Etiennea. J., Gérard., L, Tristana., A.** 2008. Les infections communautaires à *Staphylococcus aureus* en pédiatrie : émergence des Staphylocoques dorés résistants à la méticilline d'origine communautaire. *Revue Francophone des Laboratoires*. 407 : 71-80.
38. **E. Shin, H. Hong, J. Park, Y. Oh, J. Jung, Y. Lee,** Characterization of *Staphylococcus aureus* fecal isolates associated with food-borne disease in Korea, *J. Appl. Microbiol.* 2016).
39. **EL Kouri D., Pottier M.A., Trewick D., Le Gallou F., Baron D., and Potel G. (1998).** Infections à staphylocoques: aspects cliniques et bactériologiques. *Encycl Méd Chir, (Elsevier, Paris), Maladies Infectieuses, 8-007-A-10,8p.*
40. **Elizabetha Rodrigues da Silva and Nivaldo da Silva** Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil *Can J Vet Res.* 2005 Oct; 69(4): 260–264.
41. **Esan, C.O., Famurewa, O., Lin, J., Shittu, A.O. (2009).** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from health care institutions in Ekiti and Ondo States, South-Western Nigeria. *African Journal of Microbiology* .
42. **Fasquelle R. (1974).** *Éléments de bactériologie médicale 9^{ème} édition.* Flammarion, Paris. 27-36.
43. **Fasquelle R. 1974.** *Éléments de bactériologie médicale. 9^{eme} édition.* Flammarion, Paris. 27-36.
44. **Fauchere J.L. and Avril J.L. (2002).** *Bactériologie générale et médicale.* ellipses, Paris. 213-217.
45. **Ferron A. (1984).** *Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition.* CROUAN et ROQUES, Paris. 87-94.
46. **Garnier F., Chainier D., Walsh T., Karlsson A., Blomström A., Grelaud C., Mounier M., Denis F. and Ploy M.C. (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.
47. **Garrity G.M., Johnson K.L., Bell J. et Searles D.B. 2007.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Second edition. New York.
48. **Garrity G.M., Lilburn T.G., Cole J.R., Harrison S.H., Euzéby J. and Tindall B.J.** *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007*” Part 9- the Bacteria: Phylum” Firmicutes”: Class “Bacilli”.

49. **Gindonis,V., Taponen,S., Myllyniemi,A., Pyörälä,S., Nykäsenoja,S., Salmenlinna,S., Lindholm, L. and Rantala, M.,** “Occurrence and characterization of methicillin-resistant staphylococci from bovine mastitis milk samples in Finland”, *Acta Veterinaria Scandinavica*, Vol. 55, pp. 61-68, 2013.
50. **Gordon L., Cloeckart A., Doublet B., Schwarcz S., Bouju-Albert A., Ganiere J.P., Le Bris H., Le Fleche-Mateos A., Giraud E. 2008.** Complete sequence of the floRcarrying multiresistance plasmid pAB5S9 from fresh water *Aeromonas bestiarum*. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 65-71.
51. **Grosjean, J, Clavé, D., Archambaud, M, et pasquier, C. 2011.** *Bactériologie et virologie pratique, de boeck* , 2eme Edition révisée.290 : 73-76
52. **H. Hasman, A. Moodley, L. Guardabassi, M. Stegger, R.L. Skov, F.M.Aarestrup,** Spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry, *Vet. Microbiol.* 141 (3–4) (2010) 326–331.
53. **Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. and Wagner, M. (2001).** Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3122-3126.
54. **Hein,A. Lehner,P. Rieck,K. Klein,E. Brandl,M. Wagner** ,Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese,*Appl. Environ. Microbiol.* 67 (2001) 3122–3126.
55. **Hennekinne, J., De Buyser, M., & Dragacci, S. (2012).** *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiology Reviews*, 36, 815-836.
56. **Hiron A. 2007.** Les transporteurs de peptides de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat en Microbiologie. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l’Environnement (Agro Paris Tech). Paris.
57. **Holden M.T., Feil E.J. and Linsay J.A. et al. (2004).** Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains : evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101:** 9786-9791.
58. **Holeckova B, Holoda E, Fotta M, Kalinacova V, Gondol J, GrolmusJ.** Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann Agric Environ Med.* 2002; **9** (2):179–82.
59. **Holeckova B., Kalivacova V., Julius Gondol J., Fotta M., Holoda E., Blickova E. 2004.** Production of enterotoxins by *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. *Bull. Vet. Inst. Pulwy,* 48 :41-45.

60. **Hovde C.J., Marr J.C., Hoffmann M.L.Hackett S.P., Chi Y.I., Crum, K.K., Stevens D.L., Stauffacher C.V., Bohach G.A. 1994.** Investigation of the role of the disulphide bond in the activity and structure on staphylococcal enterotoxin C1. *Mol. Microbiol.* 13, 897-909.
61. **ISO 6888-1 1999** Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces)
62. **ISO 6887-1 2003** Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination —
63. **J.A. Hennekinne, M.L. De Buyser, S. Dragacci** *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation *FEMS Microbiol. Rev.*, 36 (2012), pp. 815-836.
64. **Jeljaszewicz J., Switalski M. and Adlam C. (1983).** Staphylocoagulase and clumping factor. In «*Staphylococci and Staphylococcal infections*», CSF Easmon and C.Adlam (ed). Vol.2, Academic Press, London. 525-557.
65. **John Wiley & Sons, Inc., (2009)** *Staphylococcus*. in association with Bergey's Manual Trus DOI: 10.1002/9781118960608.gbm00569
66. **Karthik Sambantha moorthy. 2007.** Role of MSA in the regulation of virulence and biofilm formation. The university of Southern mississippi. Edition UMI Microform USA. pp20-24.
67. **Kateete, D.P., Kimani, C.N., Katabazi, F.A., Okeng, A., Okee, M.S., Nanteza, A., Joloba, M.L., Najjuka, F.C. (2010).** Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 23.
68. **Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML** Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France *Int J Food Microbiol.* 2007 Apr 20; 115(3):369-75.
69. **Kotzekidou, P. 2013.** Microbiological examination of ready-to-eat foods and ready-to-bake frozen pastries from university canteens. *Food Microbiol.* 34:337-343.
70. **Kuroda M., Ohta T. and Uchiyama I et al. (2001).** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **357**: 1225-1240.
71. **Kuroda M., Ohta T. and Uchiyama I et al. (2001).** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet.* **357**: 1225-1240.

72. **Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I., Baba T., Yuzawa H., Kobayashi I., Cui L., Oguchi A., Aoki K., Nagai Y., Lian J., Ito T., Kanamori M., Matsumaru H., Maruyama A., Murakami H., Hosoyama A., Mizutani-Ui Y., Takahashi N. K., Sawano T., Inoue R., Kaito C., Sekimizu K., Hirakawa H., Kuhara S., Goto S., Yabuzaki J., Kanehisa M., Yamashita A., Oshima K., Furuya K., Yoshino C., Shiba T., Hattori M., Ogasawara N., Hayashi H. et Hiramatsu K. (2001).** Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 357 (9264), 1225-40.
73. **Lange C, Cardoso M, Senczek D, Schwarz S.** Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. *Vet Microbiol.* 1999;67:127–141.
74. **Le Loir et Gantier,** 2009, *Infection: S.aueus*. Page 165.
75. **Le Loir Y, Baron F, Gautier M. 2003.** *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet. Mol. Res.* 2 : 63-76.
76. **Le Minor L. and Veron M. (1990).** *Bactériologie Médicale «Staphylococcus et Micrococcus»* J.Fleurette 2ème édition. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 773794.
77. **Lina Casale Aragon-Alegro Eliziani Mieko Konta arina Suzuki Márcia Guimarães Silva Ary Fernandes Júnior Ricardo Rall Vera Lúcia Mores Rall** Occurrence of coagulase-positive *Staphylococcus* in various food products commercialized in Botucatu, SP, Brazil and detection of toxins from food and isolated strains 2007 630-634.
78. **M. Á. Argudín, C. M. María, and R. R. María,** Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins (Basel).* 2(7), 2010, 1751–1773.
79. **Madison BM, Baselski VS.** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* in blood cultures by thermonuclease testing. *J Clin Microbiol.* 1983 ;18 : 722-724.
80. **Mamette A. (2002)** - virology medicale, presses universitaire de lyon.
81. **Meyrand, A., Atrache, V., Bavai, C., Montet, M.P., Vernozy-Rozand, C. (1999).** An automated method for the detection of staphylococcal heat stable deoxyribonuclease in dairy products. *Letters in Applied Microbiology,* 29, 216–20.
82. **Min, K., Jungi, Y., Kwoni, K., Kim, J., Hwang, I., & Yoon, K. (2013).** Effect of temperature on the production of staphylococcal enterotoxin and thermal inactivation kinetics of *Staphylococcus aureus* in selected ready-to-eat (RTE) foods in Korea. *Journal of Food Safety,* 33, 17-24.
83. **Ministere du commerce 2017,** Rapport relative aux intoxications alimentaires enregistrées Durant l'année 2016

84. **Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A.** Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2119–2125.
85. **Morandi, S., 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.
86. **Morea M., Baruzz F., Coconcelli P.S. 1999.** Molecular and physiological characterization of dominant bacterial population in traditional mazzarella cheese processing. *J. of applied Microbiology* 97,574-582.
87. **Mullis K, Faloona F, Scharf S, et al.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986 ; 51(1):263- 273.
88. **N.H. Kim, A.-R. Yun and M.S. Rhee** Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea 2011.
89. **Nakano S, Kobayashi T, Funabiki K, et al.** PCR detection of *Bacillus* and *Staphylococcus* in various foods. *J Food Pro-tect.* 2004;67(6):1271-1277.
90. **Necidová L., Z. S., M. Pospisilova, J. Strejcek, M. Duskova et R.Karpiskova.** 2009. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *Czech J. Food Sci.* 27: 127-133.
91. **Nehal M., Zuel-Fakkar M.D., Mona H., Eh-Shokry M.D. 2010.** Study of Erythroderma and psoriasis Exacerbation by Staphylococcal Superantigens. *J. Egypt Women Dermatol. Soc.* 7,133-117.
92. **Nîmes M. (2007).**, la réaction de polymérisation en chaîne (pcr) principe et applications, Ecole de l'ADN , Nîmes cedex 1, Vol.30015, France, p.21-23
93. **O. Aslantas, C. Demir, H. Turutoglu, Z. Cantekin, Y. Ergun, G. Dogruer** Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 31 (2006), pp. 253-257.
94. **Omoe K., Hu D. L., Takahashi-Omoe H., Nakane A. et Shinagawa K.** (2003). Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. *Infect Immun* 71 (10), 6088-94. .

95. **Poli MA, Rivera VR, Neal D.** Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. *Toxicon*. 2002;40(40): 1723-1726.
96. **Portocarrero, S. M., Newman, M., & Mikel, B.** (2002). *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science*, 62, 267–273)
97. **Quinn P.J., Markey BK, Leonard F.C., Hartigan P., Fanning D., FitzPartrick ES 2011.** *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Edition Blackwell-science, USA. pp 893.
98. *Research*, 3(12), 962-968.
99. **Rodrigues da Silva E, Silva N.** Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005;69:260–264.
100. **Rumbaugh Kendra P,** 2014. *Antibiofilm Agents: From Diagnosis to Treatment and Prevention*. Page 241.
101. **Scharg et Kleger,** 2011, Syndrome du choc toxique.
102. **Schmid D, Fretz R, Winter P, Mann M, Höger G, Stöger A, Ruppitsch W, Ladstätter J, Mayer N, de Martin A, Allerberger F** Outbreak of staphylococcal food intoxication after consumption of pasteurized milk products, June 2007, Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2009; 121(3-4):125-31.
103. **Senait G.,** Pro.A.R.S.Moorty Isolation and Identification of *Staphylococcus* Species from Ready-To-Eat Meat Products in and Around Debre-Zeit, Ethiopia *International Journal of Research in Agriculture and Forestry* Volume 3, Issue 4, April 2016, PP 6-16 ISSN 2394-5907 (Print) & ISSN 2394-5915.
104. **Seyed Mostafa Hosseini, Hamid Kazemian, Hassan mahmoudi, Mohammad Reza Arabestan .** 2016, Typing of coa gene polymorphism coding Coagulase in *Staphylococcus aureus* isolated from foodstuffs by PCR and correlation to antibiotic resistance *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences* ISSN: 0974-2115.
105. **Shimizu, A., M. Fujita, H. Igarashi, M. Takagi, N. Nagase, A. Sasaki, and J. Kawano.** 2000. Characterization of *Staphylococcus aureus* coagulase type VII isolates from staphylococcal food poisoning outbreaks (1980–1995) in Tokyo, Japan, by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 38:3746–3749.
106. **Shin H, Kim M, Yoon E, et al.** Isothermal target and probe amplification assay for the real-time rapid detection of *Staphylococcus aureus*. *J Food Protect.* 2015;78 (4):723-727.

107. **Sokari T.1991** Distribution of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat foods in eastern Nigeria. Int J Food Microbiol. 1991 Feb;12(2-3):275-9
108. **Spicer W.J. 2003.** Pratique clinique en bactériologie mycologie et parasitologie. Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 28-29.
109. **Stephen H. Gillespie, HawkeyP. M. 2006.** Principales and practice of Clinical Bacteriology 2^{ème} edition. Wiley office, England. pp 586.
110. **Stephen H. Gillespie, HawkeyP. M. 2006.** Principales and practice of Clinical Bacteriology 2^{ème} edition.Birmingham, John Wiley and Sons. pp 73-86.
111. **Studer, E., Schaeren, W., Naskova, J., Pfaeffli, H., Kaufmann, T., Kirchhofer, M. 2008.** A longitudinal field study to evaluate the diagnostic properties of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay to detect *Staphylococcus aureus* in milk. *J. Dairy Sci.*, 91: 1893-1902.
112. **Su C, Herbelin C, Frieze N, Skardova O, Sordillo LM.** Coagulase gene polymorphism of *Staphylococcus aureus* isolates from dairy cattle in different geographical areas. *Epidemiol Infect.* 1999;122:329–336.
113. **Su Kyung Oh, Nari Lee Young Sun Cho,Dong-Bin Shin,Soon Young Choi, and Minseon Koo** Occurrence of Toxigenic *Staphylococcus aureus* in Ready-to-Eat Food in Korea *Journal of Food Protection*, Vol. 70, No. 5, 2007, Pages 1153–1158.
114. **Su Y. C. et Wong A. C. (1996).** Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzymelinked Immunosorbent assay. *J Food Prot* **59** (3), 327-30.
115. **Su Y. C. et Wong A. C. (1998).** Production of staphylococcal enterotoxin H under controlled pH and aeration. *Int J Food Microbiol* **39** (1-2), 87-91.
116. **Sung YJ, Suk HJ, Sung HY, et al.** Novel antibody/gold nanoparticle/magnetic nanoparticle nanocomposites for immunomagnetic separation and rapid colorimetric detection of *Staphylococcus aureus* in milk. *Biosens Bioelectron.* 2013;43(1):432-439.
117. **Szabo, R.A. (2001).** Determination of *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease in food. Published on the Food Directorate's (Health Canada's) website at <http://www.hc-sc.gc.ca/food-aliment>.

118. **Tang Y.W, Waddington M.G, Smith D.H, Manahan J.M, Kohner P.C, Highsmith L.M, Li H, Cockerill F.R, Thompson R.L & Montgomery S.O,** Comparison of protein A gene sequencing with pulsed-field gel electrophoresis and epidemiologic data for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of clinical microbiology*, 38, 2000, 1347-1351.
119. **Tang, J., Zhou, R., Shi, X., Kang, M., Wang, H., Chen, H.** (2008). Two thermostable nucleases coexisted in *Staphylococcus aureus*: evidence from mutagenesis and in vitro expression. *FEMS Microbiology Letters*, 284:176-183.
120. **Templeton NS.** The polymerase chain reaction history methods, and applications. *Diagn Mol Pathol.* (1992);1(1):58-72.
121. **U. Tsegmed, G. Normanno, M. Pringle, K. Krovacek,** Occurrence of entero-toxic *Staphylococcus aureus* in raw milk from yaks and cattle in Mongolia, *J. Food Prot.* 70 (2007) 1726–1729.
122. **V. Pereira, C. Lopes, A. Castro, J. Silva, P. Gibbs, P. Teixeira** Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal (2008).
123. **Van der Vanter, T.** (1999); Prospects for the future: Emerging problem of chemical /biological Conference of International Food Trade Beyond 2000:Science based Decision, equivalence and mutual Recognition Melbourne, Australia, Pp.11-15.
124. **Vandenesch F., Bonneville M. et Lina G.** (2001). egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. *Immunol* **166** (1), 669-77.
125. **Vishnu Sharma, Sanjita Sharma, Dinesh Kumar Dahiya, Aarif Khan, Manisha Mathur, and Aayushi Sharma.** Coagulase gene polymorphism, enterotoxigenicity, biofilm production, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk in North West India, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* (2017) 16:65.
126. **Yarwood J. M., McCormick J. K., Paustian M. L., Orwin P. M., Kapur V. et Schlievert P.M.** (2002). Characterization and expression analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity island 3. Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands. *J Biol Chem* **277** (15), 13138-47.
127. **Yarwood J.M. and Schlievert P.M.** (2003). Quorum Sensing in *Staphylococcus* infections. *J Clin Invest.* **112**: 1620-1625.
128. **Yang G., Benson R., Pelish T., Brown E., Winchell JM., Fields B.** (2010) –Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by

real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region. *Clin Microbiol Infect.* Mar; 16(3), p255-61.

129. **XIAONAN XING, GUANGHU ILI, WEISON ZHANG, XIN WANG, XIAODONG XIA, BAOWEI YANG, and JIANGHONG MENG,** Prevalence, Antimicrobial Susceptibility, and Enterotoxin Gene Detection of *Staphylococcus aureus* Isolates in Ready-to-Eat Foods in Shaanxi, People's Republic of China, *Journal of Food Protection* February 2014, Vol. 77, No. 2, pp. 331-334
130. **Xihong Zhao, Caijiao Wei, Junliang Zhong & Shiwei Jin. 2016,** Research advance in rapid detection of foodborne *Staphylococcus aureus* *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30:5, 827-833, DOI: 10.1080/13102818.2016.1209433
131. **Zhang S. et Stewart G. C. (2000).** Characterization of the promoter elements for the staphylococcal enterotoxin D gene. *J Bacteriol* **182** (8), 2321-5.
132. **Zhang S., Iandolo J. J. et Stewart G. C. (1998).** The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). *FEMS Microbiol Lett* **168** (2), 227-33.
133. **Zhang, K., Sparling, J., Chow, B.L., Elsayed, S., Hussain, Z., Church, D.L., Gregson, D.B., Louie, T., Conly, J.M., 2004.** New quadruplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4947–4955.
134. **Zhao X, Li Y, Park M, et al.** Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *femA* gene for rapid detection of *Staphylococcus aureus* from clinical and food samples. *J Microbiol Biotechnol.* 2013;23(2):246-250.

Annexes

Annexes 1 : composition des milieux de culture

Composition du milieu de culture Baird Parker au jaune d'œuf et au tellurite de potassium (g/l)

Extrait de viande	5
Extrait de levure	1
Chlorure de lithium	5
Pyruvate de sodium	10
Glycine	12
Tellurite de potassium	2 mL
Emulsion de jaune d'œuf	10mL
Agar	18
Peptone de caséine	10

Composition du milieu de culture Chapman (g/l)

Peptones	10
Extrait de viande	3
Chlorure de sodium	70
Mannitol	10
Rouge de phénol	0,005
Agar	18
Tryptone	5
Extrait de levure	3

Composition de la gélose nutritive (g/l)

Extrait de viande	3
Extrait de levure	3
Peptones	5
Chlorure de sodium	5
Agar	18

Annexe 2 : critères microbiologique des aliments celons l'arrêté interministériel N° 35-1998 du 24 janvier 1998.

Critères microbiologiques des plats cuisinés

PRODUITS	I	n	I	c	I	m
1. Plats cuisinés à l'avance à base de viandes et de poissons:	I	I	I			
- germes aérobies à 30°C	I	5	I	2	I	3.10e5
- coliformes	I	5	I	2	I	10e3
- coliformes fécaux	I	5	I	2	I	10
- Staphylococcus aureus	I	5	I	2	I	10e2
- clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	I	5	I	0	I	30
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
2. Plats cuisinés à base de légumes: produits végétaux crus ensaucés:	I	I	I			
- Staphylococcus aureus	I	5	I	2	I	10e2
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence

Critères microbiologiques des ovoproduits des pâtisseries et des crèmes pâtisseries

PRODUITS	I	n	I	c	I	m
1. Oeufs en coques:	I	I	I			
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
2. Pâtisseries et crèmes pâtisseries:	I	I	I			
- germes aérobies à 30°C	I	5	I	2	I	3.10e5
- coliformes	I	5	I	2	I	10e2
- coliformes fécaux	I	5	I	2	I	10
- Staphylococcus aureus	I	5	I	2	I	10e2
- clostridium sulfito-réducteurs à 46°C	I	5	I	2	I	10
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
3. Mélanges pour gâteaux contenant des oeufs:	I	I	I			
- Staphylococcus aureus	I	5	I	2	I	10e2
- moisissures	I	5	I	2	I	10e2
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence
4. Tout autre ovoproduit ayant subi un traitement thermiques:	I	I	I			
- germes aérobies à 30°C	I	5	I	2	I	10e5
- enterobactéries	I	5	I	2	I	10
- Staphylococcus aureus	I	5	I	0	I	absenc
- Salmonella	I	5	I	0	I	absence

Annexe 03: Photo de quelques matériels utilisés



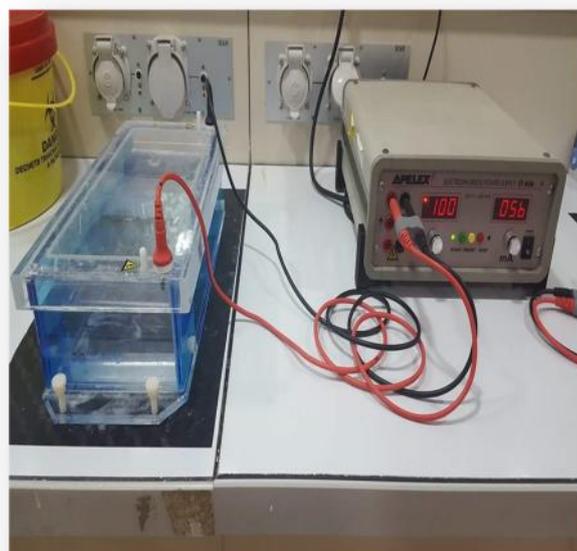
Balance



Bain Marie



Centrifugeuse



**Générateur avec cuve
à électrophorèse**



Hotte PCR



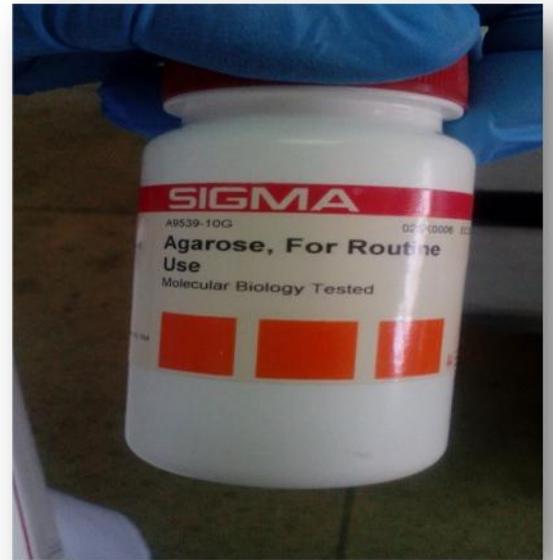
Etuve



Chambre de lecture UV



Stomacher



Poudre d'agarose



thermocycleur