

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE VETERINAIRE-ALGER

المدرسة الوطنية العليا للبيطرة - الجزائر

MEMOIRE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGISTERE EN SCIENCES
VETERINAIRES

OPTION : CONTROLE QUALITE ET ANALYSES ALIMENTAIRES

Thème

Contribution à la recherche de *Clostridium perfringens* dans les poudres de lait

Présenté par : ACHEK Rachid

Le jury :

Président : BENEDDOUCHE. B (Maitre de Conférences classe A, ENSV)
Promoteur : LEBRES. H A (Maitre de Recherche, IPA)
Examineurs : HAMDI. T M (Maitre de Conférences classe A, ENSV)
HARHOURA. K (Maitre Assistant classe A, ENSV)
AZZAG. N (Maitre Assistant classe A, ENSV)

Année universitaire : 2010/2011

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Dieu le tout puissant, de m'avoir guidé vers la science et le savoir et de m'avoir donné courage et volonté pour élaborer ce modeste travail.

Je tiens à exprimer le témoignage de toute ma gratitude et mes remerciements :

À Monsieur Lebres El Hadj Ahmed,

Maître de recherche à l'Institut Pasteur d'Algérie

Pour m'avoir proposé ce sujet ;

Pour l'aide, les conseils et les encouragements qu'il m'a prodigués ;

Pour la rigueur et la rapidité de ses corrections

Mon respect et mes chaleureux remerciements

À Monsieur BENEDEDDOUCHE Badis,

Maitre de conférences à l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger

Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury d'évaluation de ce travail

Merci pour sa disponibilité et son écoute

À Mr HAMDI T.M, Mr HARHOURA K et Mme AZZAG N,

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'examiner et d'évaluer ce travail

Mes plus sincères remerciements

À l'assistante du laboratoire d'HIDAOA de L'ENSV,

Qu'elle trouve ici l'expression de mon profond respect.

Au personnel de la bibliothèque de l'ENSV, (Hamid, Mme Meriem, Yacine, Mbarqa,...)

Pour leurs aides et leur patience

Remerciements distingués

À toutes celles et ceux qui m'ont soutenues et aidés, de près ou de loin, dans l'élaboration de ce modeste travail.

L'expression de ma reconnaissance

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, ce travail fut accompli et je le dédie à :

A la mémoire de mon père, que Dieu ait son âme ;

A ma chère mère qui s'est toujours sacrifiée pour mon éducation, qui m'a entourée de son amour et de son affection, je la remercie et je n'oublierai jamais son soutien moral dans les moments les plus difficiles, que Dieu la protège.

A ma sœur,

A mes frères : Rabeh et ses enfants, Hocine et son fils Zakaria, Mohammed et ses enfants Islem et Aya, Mehanni et sa fille Soundous et Adda.

A tous mes amis (Abdellah, Abdelkader, Brahim B, Brahim N, Mounir, Takfarinas, Karim, Amine, Mohammed, Madjid, Nessreddine, Ahmed ...)

A toute la promotion de post-graduation ENSV, 2008.

A tous ceux qui ont croisé de près ou de loin mon chemin et qui m'ont permis d'arriver là où je suis.

Rachid

SOMMAIRE

Liste des tableaux	
Liste des photos	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Résumés	

	Pages
Introduction.....	1,2

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Etude de germe *Clostridium perfringens*

I. Historique.....	03
II. Taxonomie.....	03
III. Classification.	05
1. Les bactéries anaérobies telluriques et sporulés	05
2. Les anaérobies non telluriques et non sporulées : réunis dans l'appellation de flore de Veillon	05
3. Les anaérobies extrêmement oxygène-sensibles (EOS).....	06
IV. Habitat.	06
V. Bactériologie de <i>Clostridium perfringens</i>	07
1. Caractères morphologiques.....	07
2. Caractères culturels et biochimiques.....	08
3. Formes de résistance: les spores.....	11
4. Caractères toxigènes.....	12
4.1. L'entérotoxine.....	14
4.2. La toxine α	15
4.3. La toxine β 1.....	15
4.4. La toxine β 2.....	15
4.5. La toxine ϵ	16
4.6. La toxine ι	16
4.7. Autres toxines. La perfringolysine θ	16
VI. Méthodes de recherche de <i>Clostridium perfringens</i>	19
1. Méthodes de diagnostic à partir des prélèvements pathologiques.....	19
1.1. Méthodes bactériologiques classiques.....	19
1.2. Méthodes immunologiques.	20
1.2.1. Counter-immuno-electrophorèse (CIEP).....	20
1.2.2. Méthode du test d'agglutination reverse passive.....	21
1.2.3. Méthode utilisant un essai de cellules Vero.....	21
1.2.4. Méthode ELISA.....	21
1.2.5. La séroneutralisation sur souris.....	22
1.3. Méthodes moléculaires.....	22

2. Méthodes de diagnostic de <i>Clostridium perfringens</i> à partir des denrées alimentaires.....	23
2.1. Méthodes bactériologiques classiques.....	23
2.2. Méthodes Moléculaires.....	25
XII. Principales pathologies dues à <i>Clostridium perfringens</i>	27
1. Chez l'homme.....	27
1.1. Les toxi-infections alimentaires.....	27
1.1.1. Les intoxications alimentaires à <i>Clostridium perfringens</i> type A.....	27
1.1.2. Les intoxications alimentaires à <i>Clostridium perfringens</i> type C.....	28
1.2. Les gangrènes gazeuses ou Myonécrose Clostridienne.....	28
2. Chez l'animal : L'entérotoxémie.....	29
2.1. La forme suraiguë.....	30
2.2. La forme aiguë.....	30

Chapitre II : Technologie du lait

I. Définitions.....	33
1. Le Lait.....	33
2. Le lait pasteurisé.....	33
3. Le lait stérilisé.....	33
4. Le lait stérilisé UHT.....	34
5. Le Lait en poudre.....	34
II. Différents procédés de conservation et de stabilisation du lait.....	35
1. Historique.....	35
2. Procédés de fabrication de lait en poudre.	36
2.1. Séchage sur cylindres.....	36
2.2. Séchage par atomisation.....	37
III. Microbiologie du lait en poudre.....	39
IV. Le barème de stérilisation.....	41

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel et méthode

Objectifs	44
I. Matériel	45
1. Milieux de culture et réactifs.....	45
2. Matériel de laboratoire.....	45
3. Echantillonnage.	46
II. Méthode	50
1. Principe.....	50
2. Objet et domaine d'application.....	50
3. Référentiels.....	51

4. Technique d'analyse proprement dite.....	51
5. Lecture et interprétation. Expression des résultats.....	53
6. Estimation des petits nombres de <i>Clostridium perfringens</i>	54

Résultats et discussion.

Résultats

I. Résultats de l'analyse bactériologique.....	58
II. Résultats de l'identification biochimique et du dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i>	60

III. Discussion.....

1. Méthode d'analyse bactériologique.....	65
Milieu de culture utilisé.....	66
L'utilisation de la Jarre d'anaérobiose.....	67
Température d'incubation.....	67
L'identification biochimique.....	67
L'interprétation des résultats.....	67
2. Résultats de l'analyse bactériologique.....	68
3. Résultats de l'identification biochimique et du dénombrement.....	69
4. Interprétation des résultats sur le plan technologique.....	70
5. Interprétation des résultats finaux.....	71

Conclusion.....

74,75

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : <i>Clostridium perfringens</i> : toxinotypage, génotypage et les maladies associées.....	13
Tableau II: Caractéristiques des différentes toxines élaborées par <i>Clostridium perfringens</i>	17
Tableau III : Autres enzymes élaborées par <i>Clostridium perfringens</i>	18
Tableau IV : Lésions rencontrées lors d'une entérotoxémie.....	31
Tableau V : Répartition des prélèvements en fonction de leur nature.....	48
Tableau VI: Résultats de l'analyse bactériologique des différentes poudres de laits analysées.....	58
Tableau VII : Résultats de l'identification biochimique des 07 cas positifs de <i>Clostridium perfringens</i> dans les deux catégories de lait.....	60
Tableau VIII : Résultats du dénombrement des 5 souches de <i>Clostridium perfringens</i> isolées.....	61

LISTE DES PHOTOS

Photo 01 : Aspect de <i>Clostridium perfringens</i> au coloration de Gram (forme végétative)	07
Photos 02 : Aspect de <i>Clostridium perfringens</i> sur gélose au sang. Une zone complète d'hémolyse causée par perfringolysine O et une zone incomplète causée par la toxine α	09
Photo 03 : Aspect des colonies de <i>Clostridium perfringens</i> sur gélose au lactose, au jaune d'œuf et au lait	10
Photo 04 : Aspect de <i>Clostridium perfringens</i> cultivé su gélose en jaune d'œuf. La surface gauche de la strie a été traitée avec des anticorps anti- α toxine avant inoculation, d'où l'inhibition de l'effet de la lécithinase. Cet effet peut être observé à droite où aucun anticorps n'a été appliqué	10
Photo 05 : Aspect des spores de <i>Clostridium perfringens</i>	11
Photo 06 : Congestion hémorragique intestinale observée lors d'entérotoxémie	32
Photo 07 : Rein mou et fluctuant (A) lors d'entérotoxémie et rein normal (B) chez un bovin	32
Photos 08 : Les étapes du prélèvement (poudre du lait industriel)	49
Photo 09: Dilutions décimales	63
Photo 10: Jarre d'anaérobiose avant incubation	63
Photo 11: Aspect d'une colonie caractéristique sue milieu TSC	63
Photo 12: Aspect des colonies caractéristiques sur milieu TSC	63
Photo 13: Coloration de Gram : Bacilles Gram positifs (<i>Clostridium perfringens</i>)	64
Photo 14: Colonie caractéristique transférée sur milieu Thioglycolate	64
Photo 15: Tubes de milieu Thioglycolate après incubation	64
Photo 16: Tubes de milieu LS ensemencé avant incubation	64
Photo 17: Résultats positifs sur milieu LS (précipité noir +gaz)	64

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : Procédé de séchage sur cylindres.....	37
Figure 02 : Procédé de séchage par atomisation.....	39
Figure 03 : Cinétique de l'inactivation.....	41
Figure 04 : Courbe exponentielle « temps-température ».....	43
Figure 05 : Prévalence globale des colonies sulfito-réductrices présumées être <i>Clostridium perfringens</i> dans les différentes poudres de lait analysées.....	59
Figure 06 : Représentation graphique des résultats d'identification biochimique des souches de <i>Clostridium perfringens</i>	61
Figure 07 : Représentation graphique des résultats finaux de recherche et de dénombrement.....	62

LISTE DES ABREVIATIONS

AFNOR : Agence Française de Normalisation

AFSSA : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

Aw : Activité de l'eau

BGP : Bacille Gram Positif

HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point

IANOR : Institut Algérien de Normalisation

ICMSF : International Commission on Microbiological Specifications for Foods

IPA : Institut Pasteur Algérie

ISO : International Organization for Standardization

JORADP : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire

MADR : Ministère de l'agriculture et de développement rural

NE : Norme Européenne

NF : Norme Française

ONIL : Office National Interprofessionnel du Lait

UFC : Unité Formant Colonie

RESUME

Le lait est un substrat très riche fournissant à l'homme et aux jeunes mammifères un aliment presque complet. Néanmoins, la présence de nombreux facteurs de croissance dans le lait permettra aux différentes espèces microbiennes de se développer.

Nous avons conduit une étude visant à évaluer le degré de contamination par *Clostridium perfringens* des poudres de lait importées par la mise en place de la technique NF. V 08-056, relative au dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les denrées alimentaires. Notre étude a porté sur 200 échantillons de poudre de laits au total, représentés par 100 échantillons de poudre de lait d'importation à usage industriel conditionnés en sac de 25 Kg et 100 échantillons de poudre de lait d'importation à usage direct après reconstitution conditionnés en sachets de 500 gr. Nos résultats ont montré la présence de 5 souches effectives de *Clostridium perfringens* dans les poudres de lait à usage industriel avec un taux de 5.00% et l'absence de ce dernier dans tous les échantillons de poudre de lait à consommation directe après reconstitution, ce qui suppose que ces derniers subissent des traitements plus sévères. Ce taux bien que faible, est loin d'être négligeable car il peut être à l'origine d'accidents technologiques ou de toxi-infections alimentaires.

Par ailleurs, l'expression des résultats semble être en contradiction avec la réglementation nationale. Par contre, elle est en parfaite adéquation aussi bien avec la méthode d'analyse qu'avec les principes de la technologie ainsi que la réglementation internationale. Par conséquent, la révision des textes réglementaires relatifs aux spécifications microbiologiques des denrées alimentaires devient impérative.

Mots clés : *Clostridium perfringens*, poudres de lait, contamination, critères microbiologiques, réglementation.

ABSTRACT.

Milk is a rich substance providing the young mammals and man an almost complete food. Nevertheless, its constitution on many growth factors will allow the various microbial species to develop.

We conducted a study to assess the degree of contamination by *Clostridium perfringens* of imported powdered milk based on the technique FN V. 08-056, relating to the enumeration of *Clostridium perfringens* in foods. Our study involved 200 samples of powdered milk in total, represented by 100 samples of imported milk powder for industrial use packaged in bags of 25 kg and 100 samples of imported milk powder for direct use after reconstitution packaged in bags of 500 gr. Our results showed the presence of 5 strains of *Clostridium perfringens* in milk powders for industrial use with a rate of 5.00% and the absence of the latter in all samples of powdered milk destined for direct consumption after reconstitution, which assume that they suffer a severe treatment. This rate, although low, is far from negligible because it can cause technological accidents or very serious Food poisoning threat.

Furthermore, expression of results seems to contradict national regulations. Nevertheless, it is perfectly in line with both the analytical method, the principles of technology and international regulations. Thus, the revision of our regulations relating to microbiological food becomes imperative.

Keywords: *Clostridium perfringens*, powdered milk, contamination, microbiological criteria, regulation.

الملخص:

الحليب مادة جد غنية، يوفر للإنسان وصغار الثدييات غذاء شبه كامل. لكن احتوائه على العديد من عوامل النمو يسمح لمختلف أنواع الميكروبات بالتكاثر.

لقد أجرينا هذه الدراسة من أجل تقييم درجة تلوث الحليب المجفف المستورد ببكتيريا كلوستريديوم بيرفرنجنس وهذا اعتمادا على تقنية NF.V.08-056 الخاصة بعدّ مستعمرات بكتيريا كلوستريديوم بيرفرنجنس في مختلف الأطعمة. وقد شملت هذه الدراسة 200 عينة من الحليب المجفف في المجموع، تتمثل في 100 عينة من مسحوق الحليب المستورد للأغراض الصناعية والمعبأ في أكياس 25 كلغ، و 100 عينة من مسحوق الحليب المستوردة من أجل الإستهلاك المباشر بعد إعادة التحضير والمعبأ في علب 500 غ. وقد أظهرت النتائج المتحصل عليها وجود 5 سلالات من ببكتيريا كلوستريديوم بيرفرنجنس في مسحوق الحليب الموجه للاستخدام الصناعي أي بنسبة 5.00٪. في حين بينت نفس النتائج عدم وجود هذه البكتيريا في جميع عينات الحليب المجفف الموجه للإستهلاك المباشر بعد إعادة التحضير، ولهذا نفترض أن النوع الأخير من مسحوق الحليب خضع لمعالجة ورقابة أكثر صرامة. هذه النسبة المحصل عليها وإن تبدو منخفضة، لا يجب إهمالها لأنه يمكن أن تسبب حوادث تكنولوجية أو تسممات غذائية.

وعلاوة على ذلك، التعبير عن النتائج المحصل عليها يبدو أنه يتعارض مع التشريع الوطني. لكن بالمقابل يتماشى تماما مع طريقة التحليل المستعملة في دراستنا وعلى حد سواء مع مبادئ التكنولوجيا والتشريعات الدولية. مما يفرض أهمية وإلزامية مراجعة وتنقيح التشريعات المتعلقة بالأغذية في الجزائر.

كلمات المفتاح: كلوستريديوم بيرفرنجنس، الحليب المجفف، التلوث، المعايير الميكروبيولوجية، التشريع.

INTRODUCTION.

Le lait est un aliment complet de grand intérêt nutritionnel, utilisé à grande échelle pour l'alimentation humaine comme source de protéines animales.

Actuellement en Algérie, la production laitière nationale ne couvre que 18% des besoins usuels (MADR, 2009). Par conséquent, cette production reste insuffisante pour satisfaire les besoins accrus des consommateurs. Pour combler ce déficit, l'état a eu recours, depuis de nombreuses années, à l'importation des poudres de lait aussi bien pour les besoins industriels que pour la consommation directe. A cet effet, il y a lieu de rappeler, d'une part, que la production de lait cru n'a pas dépassée les 2,45 milliards de litres en 2009, et que, d'autre part, l'importation de poudres de lait effectuées par l'Office National Interprofessionnel du Lait (ONIL) a été de 120.000 tonnes pour l'année 2009 pour un montant de 862,76 millions de dollars (MADR, 2009).

Par ailleurs, suite aux différentes épidémies mondiales de ces dernières années, les aspects de salubrité et surtout de sécurité alimentaire se sont imposés d'eux-mêmes aussi bien aux industriels laitiers qu'aux consommateurs, multipliant ainsi les contrôles à plusieurs niveaux de transformation. De nos jours, la tendance internationale vise la certification des industries agro-alimentaires de production par la mise en place des stratégies de contrôle basées sur l'analyse des dangers physiques, chimiques et biologiques qu'à la maîtrise des points critiques, en tenant compte de l'aspect environnemental.

C'est ainsi et en vue d'être commercialisées sur de longues distances, les poudres de lait subissent préalablement des traitements thermiques liés aux procédés de conservation et de stabilisation. Ces procédés assurent la destruction de la presque totalité des germes pathogènes éventuellement présents dans les laits crus d'origine. Néanmoins, certains germes anaérobies, sporulés et thermorésistants peuvent échapper à ces procédés, vivre en état de dormance et se multiplier plus tard lors de la reconstitution des poudres de lait, menaçant ainsi aussi bien les ateliers de transformation en industrie laitière en qualité de colonisateurs d'ateliers mais aussi la santé des consommateurs. Parmi ces bactéries anaérobies et sporulées qui peuvent

persister dans les poudres de lait, on rencontre quelque fois *Clostridium perfringens*. (Larpent, 1996).

C'est donc, dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la recherche et éventuellement au dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les poudres de lait importées.

Largement répandu dans l'environnement, *Clostridium perfringens* est un bacille à Gram positif, anaérobie strict, immobile, sporulé, toxigène et impliqué universellement dans de nombreuses maladies sévères telles que les toxi-infections alimentaires chez l'homme et l'entérotoxémie chez les animaux (Hans Riemann et Dean Cliver, 2006)

Au cours de notre travail, nous avons choisi une méthode de recherche et de dénombrement de référence, spécifique, fiable, rapide et peu onéreuse. Toutefois, l'interprétation des résultats obtenus est en discordance avec les textes réglementaires nationaux en vigueur. Par contre, la technologie de production des poudres de lait, la méthode utilisée et les textes réglementaires internationaux sont en parfaite harmonie d'interprétation.

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

ETUDE DE GERME

Clostridium perfringens

I. Historique.

Clostridium perfringens a été cultivé et isolé pour la première fois par Achalme en 1891, chez un patient souffrant de rhumatisme (Bland et al, 2000 ; Manteca et al, 2000). Welch et Nuttal (1892) puis Frankel (1893) l'étudièrent de nouveau. Ils décrivent ses principaux caractères et son pouvoir pathogène chez l'homme comme un agent de gangrène gazeuse. Ils lui donnent le nom de *Bacillus aerogenes capsulatus* (Manteca et al, 2000).

En France, Veillon et Zuber (1898) l'isolèrent à partir d'appendicites aiguës (Veron et al, 1989 ; Bland et al, 2000). Son importance en qualité d'agent de gangrène gazeuse apparut au cours de la première guerre mondiale (Bland et al, 2000).

Dalling individualisa mieux l'espèce en 1926 et classa *Clostridium perfringens* selon différents groupes toxémiques. La classification de Wildson fut établie en 1933 (Manteca et al, 2000).

Mac Farlane et Knight (1941) caractérisent la toxine α . Bosworth (1943) puis Oakley (1949) caractérisent les autres principales toxines.

Hobbs (1953) met en évidence le pouvoir entérotoxique de certaines souches chez l'homme (Manteca et al, 2000) et l'entérotoxine est caractérisée par Hauschild et Duncan (Veron et al, 1989).

II. Taxonomie.

Les *Clostridium*, bactéries anaérobies sporulées comprennent plus de 150 espèces (Bergey's Manual, 2004). Elles peuvent être des espèces saprophytes non pathogènes pour l'homme, des espèces saprophytes pouvant être pathogènes occasionnelles ou des espèces toxigènes très pathogènes pour l'homme et pour les animaux.

Les *Clostridium* peuvent être classés en quatre groupes physiologiques qui interviennent dans de nombreuses fermentations industrielles. Ils comportent :

- Plus de 60 espèces saccharolytiques dont *Clostridium botulinum E*, *Clostridium difficile*, *Clostridium fallax*, *Clostridium novyi A*, *Clostridium septicum*, *Clostridium thermobutyricum*, *Clostridium thermocellum*, *Clostridium thermolacticum*.
- Des espèces protéolytiques dont : *Clostridium histolyticum*, *Clostridium tetani*...
- Des espèces protéolytiques et saccharolytiques dont : *Clostridium bifermentans*, *Clostridium botulinum A, B, C, D et F*; *Clostridium novyi B et C*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sordellii*, *Clostridium sporogenes*.
- Des espèces spécialisées.

Parmi ces espèces, certaines sont pathogènes pour l'homme ou pour les animaux, d'autres forment le groupe des *Clostridium* Sulfito-Réducteurs. Toutes ces espèces sont classées dans la famille des Clostridiaceae de la classification phylogénétique (Bergey's Manual, 2004).

L'espèce *Clostridium perfringens* a d'abord été rattachée au genre *Bacillus*. Elle fut ensuite incluse dans le genre des *Clostridium*s ; deux noms d'espèces ont été proposés à peu près en même temps et ont été très utilisés : *Clostridium perfringens*, et *Clostridium welchii*. Pribam (1929), puis Prévot (1938) a inclut cette espèce dans un genre différent, *Welchia*, en raison de caractères atypiques pour un *Clostridium* : absence de mobilité et de flagelles, présence d'une capsule.

Actuellement, on admet qu'il existe une seule espèce, *Clostridium perfringens*, avec 5 sous types A à E, le type F préalablement décrit étant maintenant inclut dans le type C (Patrick et Sylvie, 2005).

La classification du Bergey est la suivante (Bergey, 1994) :

- Embranchement des Firmicutes,
- Groupe 18 : bâtonnets sporulés, Gram positifs,
- 10 genres de bactéries sporulées dont *Bacillus* et *Clostridium*
- Plus de 100 espèces de *Clostridium*, réparties en quatre groupes phylogéniques.

La classification phylogénique est la suivante :

- Domaine : Bactéria ou Eubacteria
- Phylum XIII : Firmicutes ou bactéries à Gram +, G+C% faible
- Classe : Clostridia
- Ordre : Clostridiales
- Famille : Clostridiaceae, autres familles
- Dans la famille des Clostridiaceae : 23 genres dont le genre *Clostridium*.
- Espèce : *Clostridium perfringens* (Camille, 2007).

III. Classification.

La classification des bactéries anaérobies, basée sur plusieurs critères, permet de distinguer :

1. Les bactéries anaérobies telluriques et sporulés : qui sont des bacilles à gram positif (BGP), vivant généralement dans le sol, très résistants car sporulés et pouvant élaborer une toxine protéique. Elles comprennent :

- Les anaérobies saprophytes,
- Les anaérobies causant des maladies graves, telles que le botulisme et le tétanos,
- Les anaérobies causant des gangrènes gazeuses,
- Une bactérie intermédiaire : *Clostridium perfringens* pouvant donner des gangrènes gazeuses mais aussi des septicémies compliquées de manifestations toxiques.

2. Les anaérobies non telluriques et non sporulés : réunis dans l'appellation de flore de Veillon :

- Bactéries de morphologie variable,
- Commensaux des muqueuses humaines et animales,
- Fragiles,
- N'élaborant généralement pas de toxines,
- Pathogènes occasionnellement : infections localisées, septicémies.

3. Les anaérobies extrêmement oxygéo-sensibles (EOS)

- Commensaux du tube digestifs (homme, animaux),
- Immédiatement tués au contact de l'air,
- Morphologie variable,
- Classification et caractères actuellement à l'étude,
- Non pathogènes, rôle important dans les processus immunitaires (Piliet et al, 1986),

D'après des travaux récents, basés sur des études phénotypiques et génétiques (étude du G+C%), il semble que la position des *Clostridium* est actuellement difficile à définir. En effet, les *Clostridium* forment un groupe très hétérogène, et seront peut être par la suite séparés en plusieurs genres différents, eux-mêmes rapprochés à d'autres bactéries ne formant pas de spores mais à caractères biochimiques très semblables (Poumeyrol, 1996).

Quoi qu'il en soit, les *Clostridium* sont classiquement définis comme des bactéries de la famille des bacillaceae à Gram positif, de forme bacillaire, et anaérobies strictes. Bien que pour certaines espèces, elle soit difficile à mettre en évidence, tous les *Clostridium*s peuvent former une spore, ronde ou ovale, souvent déformante (Bourgeois et al, 1996).

IV. Habitat.

Bien que *Clostridium perfringens* soit extrêmement répandu dans la nature, son habitat préférentiel est un habitat anaérobie. La plupart du temps, *Clostridium perfringens* est retrouvé dans les sols, l'air, l'eau ou les poussières mais c'est aussi un commensal des flores intestinales, vaginales ou des voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux, et même sur la peau (Piliet et al, 1986).

Il est occasionnellement rencontré dans le rumen, en faible nombre. Il est détruit dans l'abomasum. Dans les conditions normales, il peut être présent dans l'intestin grêle, le cæcum et le colon.

Capable de tolérer une semi-anaérobiose, il contamine sous forme sporulée certains aliments (Viande, Lait, Fruits, Légumes) et sa présence dans les eaux est un critère de contamination fécale (Anonyme, 2005) (Latour, 2004).

V. Bactériologie de *Clostridium perfringens*.

1. Caractères morphologiques.

Clostridium perfringens peut être observé sous la forme d'une cellule végétative, dans l'intestin des ruminants le plus souvent, ou sous la forme sporulée, dans l'environnement.

Clostridium perfringens est un bacille à Gram positif, épais et large, de 4 μm de long et de 1 à 1,5 μm de large. Il se présente comme un bâtonnet droit à bords parallèles et aux extrémités carrées. Ces bacilles sont soit isolés, soit en paires et parfois même groupés en amas (Daube, 1992 ; Manteca, 2000 et Walker et *al*, 2004). (Photo 01). Il est immobile, non flagellé et acilié. Toutes les souches possèdent une capsule d'épaisseur variable (en fonction des souches), qui peut être discernée par coloration à l'encre de Chine de manière aisée sur un prélèvement (Veron et *al*, 1989).



Photo 01 : Aspect de *Clostridium perfringens* au coloration de Gram (forme végétative) (Anonyme 01).

2. Caractères culturels et biochimiques.

La croissance de *Clostridium perfringens* est favorisée par la présence de sucres fermentescibles. Elle est possible en présence de bile jusqu'à une concentration de 20 % et de 2 % de NaCl. Par contre, elle est complètement inhibée en présence de 6,5 % de NaCl.

Une assez grande gamme de pH permet la culture de *Clostridium perfringens* variant de 5,50 à 8,00 (Veron et al, 1989 et Walker et al, 2004).

L'Aw minimale permettant la croissance de *Clostridium perfringens* est d'environ 0,94, ce qui correspond à des saumures de concentration 10 à 11 grammes de NaCl pour 100 g de saumure (Jacobsen et Trolle, 1979) (ICMSF, 1996).

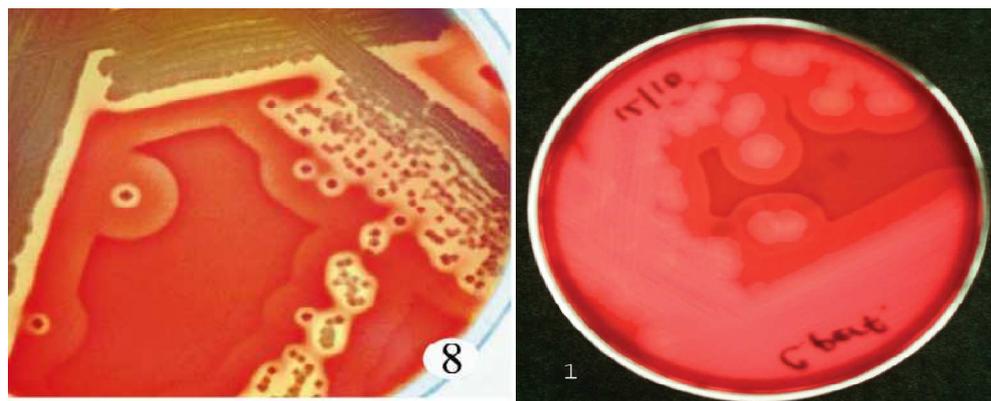
En fait, selon les souches, les limites de culture se situent pour des Aw de 0,945 à 0,930 et il semble que les agents ioniques (KCl, NaCl) soient plus inhibiteurs que les agents non ioniques (glucose, glycérol par exemple). Il a été montré que le nitrite de sodium associé au chlorure de sodium était très efficace pour prévenir la croissance de *Clostridium perfringens*, comme celle de *Clostridium botulinum* (ICMSF, 1996).

La croissance, la sporulation et la germination de *Clostridium perfringens* nécessitent pour se réaliser, les mêmes niveaux d'Aw, (Troller, 1986). *Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie stricte, aérotole'ante. Sa croissance est possible en surface avec 5 % d'oxygène en présence d'un catalyseur activé par l'hydrogène.

En surface d'un milieu solide au sang frais, généralement gélose Columbia® additionnée de sang de cheval et après 24 à 48 heures d'incubation, les colonies sont souvent rondes de 3 à 5 mm de diamètre. Souvent, elles sont lisses à bords réguliers, blanches à légèrement jaunâtres avec un centre grisâtre.

Sur ce même milieu, ces colonies sont entourées d'une double zone d'hémolyse : d'abord un halo clair de lyse complète et de diamètre assez faible correspondant à l'hémolyse θ , puis un halo, de plus grand diamètre, trouble, de lyse incomplète correspondant à l'hémolysine α (phospholipase C) (Uzal et Songer, 2008).

La photo 02 montre l'aspect hémolytique de *Clostridium perfringens* sur gélose au sang.



Photos 02 : Aspect de *Clostridium perfringens* sur gélose au sang. Une zone complète d'hémolyse causée par perfringolysine O et une zone incomplète causée par la toxine α . (Uzal et Songer, 2008), (Uzal et Songer, 2005).

En gélose profonde, *Clostridium perfringens* forme, en profondeur des colonies lenticulaires mais le gaz (H_2S) produit en grande quantité disloque la gélose, d'où la dénomination de *perfringens* du latin: qui signifie qu'il brise la gélose (Veron et al, 1989).

Sur bouillon viande-foie, un trouble du milieu est observable ainsi qu'un dégagement de gaz à odeur âcre (Veron et al, 1989).

Sur gélose à l'œuf la phospholipase C élaborée par toutes les souches, est responsable de l'opalescence observée autour des colonies (Berche et al, 1988).

Le lait tournesolé est coagulé rapidement par *Clostridium perfringens*, avec acidification et rétraction du caillot (stormy clot des Anglo-saxons) (Tony Hart et al, 1997).

Sur Gélose au lactose, jaune d'œuf, et au lait, *Clostridium perfringens* produit à 37°C et en 48 h, des colonies rosées par fermentation du lactose, entourées d'un halo opaque dû à la dégradation de la lécithine comme le montre les photos n° 03 et 04 ci-après (Labbe, 2001) (Tony Hart et al, 1997).

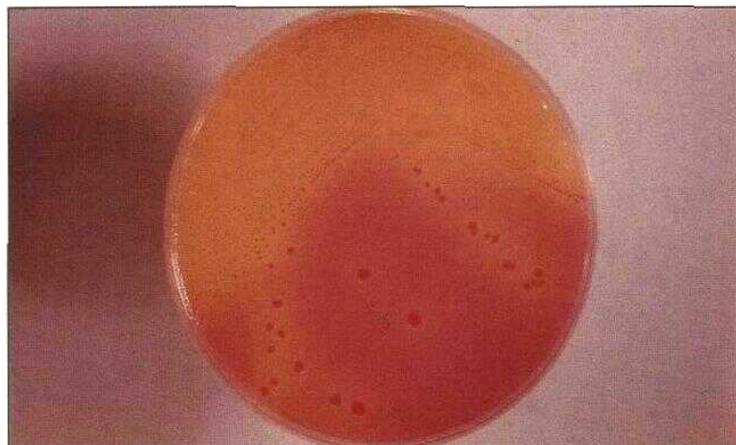


Photo 03 : Aspect des colonies de *Clostridium perfringens* sur gélose au lactose, au jaune d'œuf et au lait (Tony Hart et al, 1997).

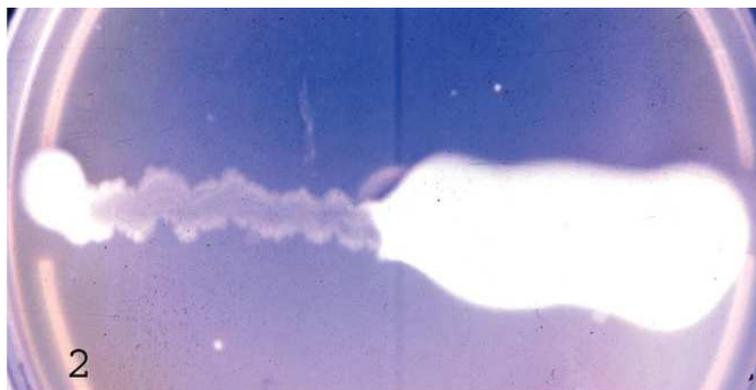


Photo 04 : Aspect de *Clostridium perfringens* cultivé su gélose en jaune d'œuf. La surface gauche de la strie a été traitée avec des anticorps anti- α toxine avant inoculation, d'où l'inhibition de l'effet de la lécithinase. Cet effet peut être observé à droite où aucun anticorps n'a été appliqué (Uzal et Songer, 2008).

Clostridium perfringens hydrolyse la gélatine et produit en abondance de l'hydrogène sulfuré à partir des acides aminés soufrés et réduit les sulfites en sulfures. Par contre l'hydrolyse de l'esculine est irrégulière et la production d'indole est nulle ou très faible. (Labbe, 2001)

De nombreux glucides sont fermentés avec production d'acide et de gaz, notamment le glucose, le lactose, le maltose, le saccharose et le raffinose (Labbe, 2001).

Le diagnostic peut être affirmé par l'analyse des produits de fermentation par chromatographie en phase gazeuse : les principaux produits sont l'acide acétique, l'acide butyrique et l'acide lactique (Berche et al, 1988) (Veron et al, 1989 et Walker et al, 2004).

Sur gélose TSN, les colonies de *Clostridium perfringens* apparaissent en profondeur noires, brillantes, irrégulières et de plusieurs millimètres de diamètre (Ferney et al, 2007).

Sa température habituelle de croissance est comprise entre 34 et 37 °C, avec un optimum à 46°C. Cette température est utilisée lors de l'incubation pour enrichir les cultures. Mais la croissance est possible entre 10 et 50°C (Afssa, 2006).

3. Formes de résistance: les spores.

Clostridium perfringens est capable de sporuler. Cette capacité lui permet de résister dans le milieu extérieur et de se propager directement ou par l'intermédiaire d'aliments souillés lorsque les conditions (modification de pH et de température) ne sont plus favorables à sa survie (Daube, 1992) (Veron et al, 1989) et (Walker et al, 2004).

La photo suivante montre bien l'aspect des spores de *Clostridium perfringens*.

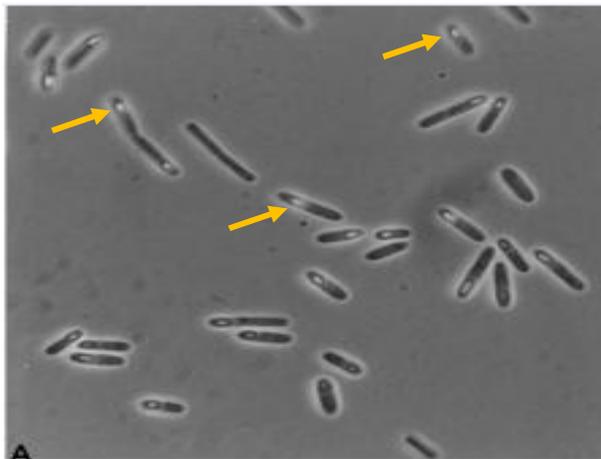


Photo 05 : Aspect des spores de *Clostridium perfringens* (Hans Riemann et Dean Cliver, 2006)

Les spores sont ovales, thermo-résistantes et peuvent être libres ou emballées dans leur sporange (Duncan et al, 1972 et 1973). La formation de spores mûres thermo-résistantes sur des milieux usuels de croissance est généralement bloquée au stade II

(formation de septum). *Clostridium perfringens* sporule plus facilement dans l'intestin (Duncan et al, 1972). De plus, l'exposition à l'acidité gastrique pourrait améliorer la capacité de sporulation des souches (Wrigly et al, 1995).

La forme sporulée est une forme de résistance à la chaleur, aux rayons ultraviolets, à la dessiccation et à de nombreux désinfectants. *Clostridium perfringens* peut ainsi subsister de longues périodes dans l'environnement, et 330 jours dans les viandes (Anonyme, 2005) (ICMSF, 1996).

Le déterminisme de la sporulation est environnemental : un arrêt de croissance bactérienne dû à un manque de molécules nutritives, à l'exposition à une atmosphère oxygénée, ou à la déshydratation provoque l'acquisition de cette forme de résistance. Inversement, la présence de conditions de croissance favorables permet le retour à la forme végétative (Leonhart, 2004).

Par ailleurs, le déterminisme de la production de l'entérotoxine est codé par le même que celui de la sporulation. Ainsi, l'augmentation du taux d'entérotoxine est proportionnelle au nombre de spores formées (Veron et al, 1989) (Duncan et al, 1972).

4. Caractères toxinogènes.

Clostridium perfringens est l'espèce bactérienne produisant le plus grand nombre de toxines à activité létale. Ces toxines, de nature protéique, sont excrétées hors de la bactérie et ont une activité spécifique très élevée (Popoff, 1989). Selon la littérature, 17 toxines ont été caractérisées et d'autres toxines sont encore à l'étude (Petit et al, 1999 ; Manteca, 2002).

En fonction de leur létalité, ces toxines sont classées en toxines majeures et en toxines mineures (Walker et al, 2004).

Les toxines majeures (α , β_1 , β_2 , ϵ et ι) sont à l'origine du typage des souches de *Clostridium perfringens* (production variable de toxines entre souches du même toxinotype) (Daube, 1992). Ces dernières sont réparties en cinq types toxiniques: type A, B, C, D et E (Lefevre, 2003 ; Walker et al, 2004).

Actuellement, on s'oriente vers une classification génotypique qui prend en considération toutes les toxines produites par la souche lors de la maladie observée

(toxines majeures). L'activité biologique des toxines protéiques élaborées est à l'origine de lésions découvertes à l'autopsie mais il n'existe pas de tableaux lésionnels spécifiques en fonction de la production de toxines et du type de *Clostridium perfringens* identifié (Daube, 1992).

Les toxines mineures ou facteurs létaux mineurs sont, en général, des enzymes hydrolytiques (protéases, hémolysines etc.) qui jouent un rôle secondaire dans la pathologie et potentialisent parfois l'action des toxines majeures (Popoff, 1989). Elles sont désignées par des lettres grecques: eta, kappa, thêta, gamma, lambda, nu, delta et mu ($\eta, \kappa, \theta, \gamma, \lambda, \nu, \delta, \mu$) (Veron et al, 1989; Walker et al, 2004 et Greco et al, 2005). Toutes ces toxines sont codées par des gènes chromosomiques ou extra chromosomiques et ont des activités biologiques et des modes d'action variés (Tableau I).

Tableau I : *Clostridium perfringens* : toxinotypage, génotypage et les maladies associées
(Petit et al, 1999)

Toxinotype	Toxine majeure				Génotype	Les pathologies associées	
	α	β	ϵ	ι		Homme	Les animaux
A	++	-	-	-	<i>plc</i> <i>plc, cpe</i> <i>plc, cpb2</i> <i>plc, cpb2, cpe</i>	Gangrène Maladies gastro-intestinales intoxications alimentaires, diarrhées associées aux antibiotiques, diarrhées sporadiques et syndrome de mort subit chez les enfants	Diarrhées (poulain, porc,...) Entérite nécrotique chez les volailles
B	+	+	+	-	<i>plc, cpb1, etx</i> <i>plc, cpb1, etx, cpe</i>		Dysenterie chez les agneaux nouveaux nés Entérite hémorragique chez les veaux néonataux et les poulains entérotoxémie chez les ovins

C	+ + - -	<i>plc, cpb1</i> <i>plc, cpb2</i> <i>plc, cpb1, cpe</i> <i>plc, cpb2, cpe</i> <i>plc, cpb1, cpb2</i> <i>plc, cpb1, cpb2,</i> <i>cpe</i>	Entérite nécrotique (Pigbel, Darmbrand)	Entérite nécrotiquechez les pourcelets, agneaux, veaux et poulain entérotoxémie chez les ovins
D	+ - + -	<i>plc, etx</i> <i>plc, etx, cpe</i>		Entérotoxémie chez les agneaux brebis, veaux et les caprins
E	+ - - +			Entérotoxémie chez les veaux

4.1. L'entérotoxine.

L'entérotoxine est produite lors du processus de sporulation de *Clostridium perfringens* (Daube, 1992 et Walker et al, 2004). Il s'agit d'un composant structural de la tunique sporale incorporé à la thèque sporale (Smith et al, 1980). Elle est produite surtout par le type A de *Clostridium perfringens* (et certains isolats des types C et D). Elle est responsable d'intoxication d'origine alimentaire. Cette toxine a également été associée au syndrome de mort subite du nourrisson. Le mécanisme supposé serait que la toxine aurait une distribution systématique après avoir diffusée à partir du tractus intestinal. Son activité super antigénique sur les récepteurs $V\beta$ 6.9 et $V\beta$ 22d des lymphocytes T serait responsable des décès.

L'entérotoxine n'est produite que par 5 à 6% des isolats de *Clostridium perfringens* (Songer, 1996). Elle est codée par le gène *cpe* porté soit par un plasmide (isolats d'origine vétérinaire), soit par le chromosome (isolats provenant d'intoxications alimentaires humaines) (Ferney et al, 2007).

L'entérotoxine est formé durant la sporulation et la synthèse commence environ deux heures après l'inoculation dans le milieu de Duncan et Strong (1968). Cela correspond à la fin du stade II ou le début du stade III de la sporulation. *Clostridium perfringens* sporule facilement dans les aliments contenant la viande ou autres produits riches en protéines. C'est une bactérie exigeante et demande 13 acides aminés différents pour croître. Pendant la sporulation l'entérotoxine peut être produite et préformée dans

l'aliment mais il est peu probable que l'entérotoxine préformée cause des intoxications parce qu'une quantité de quelques milligrammes est nécessaire. L'entérotoxine est aussi thermolabile (dénaturée à partir de 55°C) et non résistante aux acides ni aux enzymes protéolytiques (Granum, 1990).

L'ingestion d'un aliment contaminé est souvent nécessaire pour rendre la bactérie capable de sporuler et de produire une grande quantité d'entérotoxine (Granum, 1990).

4.2. La toxine α :

La toxine α est une lécithinase ou phospholipase de type C hydrolysant la phosphatidylcholine (la lécithine) et de façon moindre la sphingomyeline (Nagahama et al, 1996; Smith, 1996).

Cette toxine est produite par toutes les souches de *Clostridium perfringens*, sauf cas exceptionnel de souches α négatives ou de mutants α négatifs (Songer, 1996). Elle est synthétisée en phase exponentielle de croissance (Smith, 1996; Songer, 1996).

Il s'agit de la toxine majeure produite par *Clostridium perfringens* type A, en particulier par les souches responsables de gangrènes gazeuses (souches dites classiques) alors que les souches à l'origine de toxi-infections alimentaires en produisent en quantité moindre (Veron et al, 1989).

4.3. La toxine β_1 .

Anciennement appelée toxine β , la toxine β_1 a été renommée depuis la découverte récente de la toxine β_2 (Petit et al, 1999). La toxine β_1 est une toxine nécrosante, létale, thermolabile. Elle possède une structure phospholipidique sensible à l'action de la chaleur et à la trypsine; son activité décroît rapidement après son élaboration car elle est hydrolysée. Elle reste stable à pH basique. Elle est sécrétée en phase exponentielle de croissance (Lefevre et al, 2003).

4.4. La toxine β_2 .

La toxine β_2 a été récemment isolée à partir d'une souche responsable d'entérite nécrotique mortelle chez des porcelets. Cette souche était du type C, mais la toxine a été retrouvée par la suite chez des souches de type A. Son type toxinique ainsi que son rôle

pathogène ne sont pas encore clairement élucidés (Petit et al, 1999; Walker et al, 2004; Greco et al, 2005).

4.5. La toxine ϵ .

La toxine ϵ est produite par *Clostridium perfringens* type B et D (Veron et al, 1989 et Walker et al, 2004). Elle est dermonécrosante, oedématisante et létale mais non hémolytique (Songer, 1996). Elle est souvent présente lors d'entérotoxémies des petits ruminants et plus rarement chez les bovins (Daube, 1992).

4.6. La toxine ι .

La toxine ι est la principale toxine de *Clostridium perfringens* type E décrite dans les entérotoxémies des ruminants, notamment des veaux. Actuellement, l'incidence de cette toxine en pathologie animale est faible. Chez la souris, elle est reconnue pour son activité nécrosante et létale (Popoff, 1989 et Walker et al, 2004).

4.7. Autres toxines.

Onze autres toxines peuvent être produites par *Clostridium perfringens*, mais un type (A à E) ne produit qu'un sous ensemble de ces toxines.

Les types A, B, C, D et E sont distingués sur la base de la production des toxines α , β , ϵ et ι . Le type A est : $\alpha+$, $\beta-$, $\epsilon-$ et $\iota-$; le type B : $\alpha+$, $\beta+$, $\epsilon+$ et $\iota-$; le type C : $\alpha+$, $\beta+$, $\epsilon-$ et $\iota-$; le type D : $\alpha+$, $\beta-$, $\epsilon+$ et $\iota-$; le type E : $\alpha+$, $\beta-$, $\epsilon-$ et $\iota+$ (Ferney et al, 2007).

➤ La perfringolysine θ :

Clostridium perfringens de type A, est responsable majeur de la gangrène gazeuse, produit à la fois de la toxine α (phospholipase C) et de la PFO (ou toxine thêta) ainsi que plusieurs autres protéines et enzymes. Il est difficile d'établir la contribution individuelle de chacun de ces facteurs protéiques dans la virulence de cette bactérie. Les souches de *Clostridium perfringens* dépourvues du gène de la PFO restent capables de produire une nécrose tissulaire dans un modèle de souris. L'absence paradoxale de polynucléaires dans les lésions de gangrène gazeuse serait due à l'effet de la toxine α . (Ferney et al, 2007).

Les tableaux n° II et III ci-après résument les principales toxines produites par *Clostridium perfringens*.

Tableau II : Caractéristiques des différentes toxines élaborées par *Clostridium perfringens* (Petit et al, 1999)

Toxine/Enzyme	Gène	Localisation génétique	Mode d'action	Activité biologique
α	<i>plc</i>	Chromosome	Phospholipase C/ Sphingomyelinase	cytolytique, hémolytique, dermonécrosante. létale
$\beta 1$	<i>cpb1</i>	Plasmide	Formation de pore, altération des membranes cellulaires	Cytolytique, dermonécrosante, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale
$\beta 2$	<i>cpb2</i>	Plasmide	Formation de pore, altération des membranes cellulaires	Cytolytique, létale. Nécrose hémorragique de la muqueuse intestinale
ϵ	<i>etx</i>	Plasmide	Formation de pore, altération de la perméabilité des membranes cellulaires	divers organes: foie, reins et SNC. Dermonécrosante, létale
ι (Ia)	<i>iap</i>	Plasmide	ADP-ribosylation de l'actine	Désorganisation du cytosquelette et de l'intégrité des barrières cellulaires. Dermonécrosante, létale
ι (Ib)	<i>ibp</i>	Plasmide	Composant de fixation	
Entérotoxine (CPE)	<i>cpe</i>	Chromosome/ plasmide	Formation de pores, lyse des jonctions serrées.	Cytotoxique, entérotoxique, érythémateuse, létale
δ	?	?	Hémolysine, spécifique au GM2	Facteur de virulence accessoire
θ ou PfoA	<i>pfoA</i>	Chromosome	hémolysine, spécifique au cholestérol, Oxygène sensible	Facteur de virulence accessoire

κ	<i>colA</i>	Chromosome	Collagénase, gélatinase	Facteur de virulence accessoire
λ	<i>Iam</i>	Plasmide	Protéase	Facteur de virulence accessoire
μ	<i>nagH</i>	Chromosome	Hyaluronidase	Facteur de virulence accessoire
ν	?	?	DNase	Facteur de virulence accessoire
Neuraminases (sialidases)	<i>nanH,I</i>	Chromosome	Neuraminidase	Facteur de virulence accessoire
Uréase	<i>UreA- C</i>	Plasmide	Uréase	Facteur de virulence accessoire

Tableau III : Autres enzymes élaborées par *Clostridium perfringens* (Veron et al, 1999)

Enzyme	Activité biologique
Phosphatase acide	
Sphingomyelinase	
Thyroid stimulating factor	
Fucosidase, oligosaccharase. désacétylase	Enzymes détruisant la spécificité des groupes sanguins
Hémagglutinine	

VI. Méthodes de recherche de *Clostridium perfringens*.

Actuellement, les laboratoires disposent de nombreuses méthodes de recherche de *Clostridium perfringens* ou de la toxine qui est à l'origine de l'infection, que ce soit à partir de prélèvements pathologiques ou à partir de denrées alimentaires.

Que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, les méthodes de diagnostic à partir des prélèvements pathologiques comprennent :

- Les méthodes bactériologiques classiques basées sur la recherche puis l'identification biochimique et quelques fois le dénombrement de *Clostridium perfringens*.
- Les méthodes immunologiques basées sur la mise en évidence des toxines à l'origine des infections.
- Les méthodes moléculaires basées sur la caractérisation des gènes déterminants la production de toxines spécifiques.

Les caractères liés à la spécificité, la sensibilité, la rapidité, la fiabilité et le coût varient en fonction des méthodes.

Dans le cas des contrôles Agro-alimentaires, le diagnostic repose aussi bien sur des méthodes bactériologiques classiques que sur des méthodes moléculaires.

1. Méthodes de diagnostic à partir des prélèvements pathologiques.

1.1. Méthodes Bactériologiques Classiques.

Chez les patients présentant des symptômes évocateurs d'infection à *Clostridium perfringens*, la recherche est généralement effectuée sur un échantillon de selles. Le titre en *Clostridium perfringens* entérotoxigène est généralement élevé, supérieur ou égal à 10^6 par gramme de selles. Dans le domaine médical, l'isolement et la numération de *Clostridium perfringens* sont de préférence réalisés sur des plaques de gélose au sang de mouton, incubées en anaérobiose. L'adjonction de la Néomycine (100 mg/ml) ou de la D-Cyclosérine (400 mg/ml) rendra le milieu encore plus sélectif et plus spécifique. Les colonies de *Clostridium perfringens* caractéristiques sont repiquées pour confirmation bactériologique (examen microscopique, acidification du glucose et du lactose avec production de lécithinase, gélatinase) (Patrick Fach et Sylvie Perelle, 2005).

L'identification des colonies entérotoxigènes s'effectue par repiquage en milieu de sporulation (Duncan et Strong) et recherche de l'entérotoxine par une méthode immunologique.

Dans les infections tissulaires, le prélèvement à l'écouvillon doit être évité, car le produit obtenu est peu abondant et facilement oxydé. On doit préférer les ponctions du pus à la seringue ou les prélèvements biopsiques. Si l'isolement et l'incubation en anaérobiose ne peuvent être effectués immédiatement, il est indispensable d'employer un milieu de transport qui puisse maintenir un potentiel d'oxydo-réduction convenable.

Quant à la recherche de *Clostridium perfringens* dans le sang, elle s'effectue par ensemencement d'un flacon d'hémoculture en anaérobiose, selon une technique classique (Berche et al, 1988).

Dans le cas d'entérotoxémie les prélèvements peuvent être effectués sur cadavre. Un échantillon du contenu digestif est recueilli dans un milieu de transport pour une culture en anaérobiose ou à défaut dans un tube sec de prise de sang rempli entièrement et bien bouché en limitant les bulles d'air. L'examen bactériologique peut également être entrepris sur des viscères (foie, rein, rate ...) (Uzal, 2004).

1.2. Méthodes Immunologiques.

1.2.1. Counter-immuno-electrophorèse (CIEP).

Cette technique est basée sur une réaction immunologique de précipitation entre les toxines et les anticorps anti-toxines. Les échantillons sont déposés dans des puits selon une certaine disposition. En effet, les toxines, particules chargées négativement, sont déposées dans les puits du côté de la cathode pour migrer vers l'anode, et les sérums, sans charge, sont déposés du côté anode pour migrer vers la cathode. Après un passage en chambre d'électrophorèse, pendant 30 minutes, des lignes de précipités apparaissent après révélation avec de l'acide tannique à 2%. Le titrage est possible et s'effectue par la détermination de la dernière dilution entraînant l'apparition d'un précipité (Naik et Duncan, 1977) (Meera Sharma et al, 1997).

1.2.2. Méthode du test d'agglutination reverse passive.

Des billes de latex sont sensibilisées par l'utilisation d'un sérum purifié à partir de lapins ou moutons immunisés contre les exotoxines de *Clostridium perfringens*. Elles sont enduites d'anticorps spécifiques de la toxine à rechercher. Les particules de latex sont ensuite déposées en présence du prélèvement sur des plaques de microtitration. Le témoin négatif est représenté par des particules sensibilisées avec des animaux non immunisés.

Pour obtenir une quantification des toxines, on utilise différentes dilutions des filtrats de cultures. Ils sont déposés dans des puits avec les particules de latex. La lecture consiste à détecter une agglutination pour les différentes dilutions réalisées. Le test est considéré comme positif lorsqu'une agglutination s'effectue dans le fond du puit et négatif si celle-ci n'est présente (Kadra et al, 1999).

1.2.3. Méthode utilisant un essai de cellules Vero.

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative consistant à l'interprétation de la mortalité des cellules Vero (cellules de reins de singes) induites par les toxines.

On utilise une microplaque avec des puits dans lesquels on dépose les dilutions du prélèvement et on ajoute les cellules Vero. La microplaque est incubée à 37°C pendant une nuit. Les résultats sont attribués visuellement sous forme de score (4, 3, 2, 1 ou 0) correspondant respectivement au degré de cytotoxicité (mort des cellules Vero) respectif (100%, 75%, 50%, 25% et 0%). On considère que le seuil minimal de cytotoxicité correspond à un score de 2 ou 3 (Gibert et al, 1997).

1.2.4. Méthode ELISA.

Le test ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) est une technique immunoenzymatique permettant de rechercher les anticorps ou les antigènes (toxines) dans un substrat choisi. Les solutions, issues des prélèvements, sont réparties sur des microplaques composées de puits. Les éléments du test se fixent les uns après les autres sur ce support après plusieurs étapes d'incubation. On prépare une gamme de dilutions du prélèvement contenant ou non la toxine recherchée à l'aide d'une solution tampon PBS (phosphate buffer saline : solution saline à pH physiologique). Des lavages avec du PBS-Tween (le Tween20® est un détergeant qui va améliorer l'efficacité de ceux-ci) sont

réalisés entre chaque étape pour éliminer les éléments non fixés. La technique ELISA est directe par la recherche de la toxine, on parle de «système en sandwich ou double sandwich» (McCourt et *al*, 2005) (ICMSF, 1996).

1.2.5. La séroneutralisation sur souris.

Cette technique biologique repose sur l'effet létal des toxines bactériennes. C'est la méthode de référence pour la toxinotypie. Elle correspond à la neutralisation spécifique de l'activité létale des toxines à l'aide d'antisérums sur des souris vivantes. Cette méthode consiste en l'injection d'aliquotes de filtrats de culture de *Clostridium perfringens*, issus des prélèvements, soit directement, soit préalablement neutralisé par l'antisérum spécifique.

Dans un premier temps, on inocule 0,2 ml du filtrat par voie intraveineuse aux souris. La mort de la souris, dans un délai de 30 minutes à trois heures, signale la présence d'une toxine létale. Son identification est obtenue en neutralisant les filtrats avec les sérums antitypes et en inoculant un volume de 0,3 ml de celui-ci par voie intraveineuse. La souris qui reste vivante après la neutralisation par un antisérum détermine le type de toxine présente dans le prélèvement (Bailleul, 1982).

1.3. Méthodes Moléculaires.

La PCR a été conçue par Kary Mullis en 1983, qui obtient pour ces travaux le prix Nobel de chimie en 1993 (Meugnier et *al*, 2000). Il s'agit d'une amplification sélective d'une séquence d'ADN (Acide Désoxyribonucléique) double brin servant de matrice à partir d'un couple d'amorces oligonucléotidiques s'hybridant de part et d'autre de cette séquence. Le but est de réaliser une succession de réaction de réplication afin d'obtenir de grandes quantités d'ADN suffisantes pour le détecter et l'étudier (Kadra et *al*, 1999).

Pour avoir une réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes:

- dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin (dénaturation),
- border et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques (hybridation);
- réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire (polymérisation).

A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin (Meugnier et *al*, 2000).

La méthode PCR peut être utilisée pour identifier et typer *Clostridium perfringens* dans les prélèvements notamment les fèces et le contenu intestinal (Jarrigue, 1980) (Kanakaraja et al, 1998). Le test d'amplification génique proposé était donc beaucoup moins rapide que les tests immunologiques qui peuvent détecter l'entérotoxine directement dans les selles. La méthode PCR peut cependant offrir une alternative rapide à la méthode classique lorsqu'elle est effectuée directement sur les prélèvements de selles (Vijayalakshmi Velusamy et al, 2010) (Piatti et al, 2004).

L'amplification effectuée en utilisant les gènes des toxines α , $\beta 1$, $\beta 2$, ϵ et ι et l'entérotoxine peut être simple (un seul gène), duplex (deux gènes) ou triplex (trois gènes simultanément) (Kadra et al, 1999).

Cette méthode est aussi très utile pour des investigations épidémiologiques des entérotoxémies. Elle trouve toute son application dans la mise en place de bons protocoles vaccinaux. Elle présente de plus l'avantage d'avoir un résultat rapide pour l'entérotoxine sans avoir besoin de faire sporuler les souches in vitro (Kadra et al, 1999).

2. Méthodes de diagnostic de *Clostridium perfringens* à partir des denrées alimentaires.

2.1. Méthodes Bactériologiques Classiques.

En bactériologie alimentaire, le dénombrement de *Clostridium perfringens* est souvent confondu avec celui des bactéries anaérobies sulfite-réductrices qui est réalisé dans des géloses profondes avec un alun de fer et sulfite de sodium, incubées à 46°C. On utilise aussi des géloses au TSC incubées généralement à 37°C (Michel Frederighi, 2005).

Cependant, en hygiène alimentaire, les milieux utilisés pour la recherche et le dénombrement des différentes bactéries sont en général des milieux sélectifs. La plupart des milieux de culture utilisés pour dénombrer les *Clostridium perfringens* utilisent leur propriété de sulfite-réduction. En effet, presque tous ces milieux contiennent des sulfites et des sels de fer ; la réduction des sulfites génère le dégagement d'H₂S qui réagit avec les sels de fer pour former un précipité de sulfure de fer, noir, insoluble, qui se dépose autour des colonies, et permet ainsi de les caractériser. Les milieux solides usuels sont le SPS (Sulfite, Polymyxine, Sulfadiazine), le TSN (Tryptone, Sulfite, Néomycine), le TSC (Tryptose, Sulfite, Cyclosérine) Ces milieux ont été comparés, et il semble que le TSC

donne de très bons résultats. C'est effectivement ce milieu qui a été retenu ou le dénombrement des *Clostridium perfringens* dans la norme AFNOR V 08-019 (Poumeyrol, 1996).

Lorsque la bactérie, cultivée en anaérobiose, a pu former une colonie sur un milieu gélosé à l'œuf, la présence d'une opalescence circulaire, due à l'action de la lécithinase, est un bon caractère présomptif. Mais il existe des *Clostridium perfringens*, responsables de toxi-infections alimentaires, qui ne possèdent pas de lécithinase (Poumeyrol, 1996).

Dans l'ordre de confirmer *Clostridium perfringens* isolé à partir des aliments sur boîtes de gélose, différentes méthodes de bactériologie classique sont développées. Certaines sont intégrées dans des normes nationales et internationales. Les réactions de confirmation de *Clostridium perfringens* incluent la réduction du sulfite et la fermentation du lactose en milieu lactose sulfite. La combinaison de ces deux actions est parmi les techniques décrites dans la norme ISO 1937 (version 1997). Concernant le dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les aliments, de plus cette méthode est inclut dans la norme européenne actuelle EN 13401. Les tubes contiennent le milieu du Lactose Sulfite et une cloche du Durham sont inoculés et incubés à 46°C pendant 24 h. La production du gaz à $\frac{1}{4}$ de la cloche indique la fermentation du lactose et formation d'un précipité noir au fond du tube indique la réduction du sulfite en sulfure de fer ammoniacal après addition de 0.5 ml d'une solution de métabisulfite de sodium et de 0.5 ml d'une solution de citrate de fer ammoniacal (Eisgruber et al, 2000).

La confirmation par le milieu nitrate-mobilité en combinaison avec le milieu lactose gélatine : la moitié de chaque colonie noire caractéristique est inoculée dans le milieu nitrate mobilité, l'autre moitié est inoculée dans le milieu lactose-gélatine, puis les deux milieux sont incubés en anaérobiose pendant 24h à 37°C. Si une croissance est observée loin de la ligne d'inoculation dans le milieu nitrate-mobilité, les souches sont considérées mobiles ; alors que la formation d'une couleur rouge après addition de 0.2 à 0.5 ml de réactif de nitrate confirme la réduction du nitrate. La présence du gaz et une coloration jaunâtre dans le milieu lactose-gélatine signifié la fermentation du lactose. Pour tester la liquéfaction de la gélatine, les tubes sont conservés pendant une heure à 5°C, si le milieu se solidifie, les tubes sont incubés pendant 24 h puis refroidis puis on vérifie une seconde fois la liquéfaction de la gélatine (Eisgruber et al, 2000).

Une autre méthode de confirmation de *Clostridium perfringens* est le CAMP test intégré dans la norme allemande DIN 10103 dans laquelle *Clostridium perfringens* présente une réaction positive avec ce test. Sur gélose Columbia additionnée de 5% de sang de mouton et à un mm de distance et perpendiculaire à une souche de référence de *Streptococcus agalactiae* on réalise une strie. Après incubation en anaérobiose pendant 24 h à 37 °C la toxine α produite par des souches de *Clostridium perfringens* produit une zone d'hémolyse typique en forme triangulaire (Eisgruber et al, 2000).

La réaction de phosphatase acide peut être utilisée pour confirmer *Clostridium perfringens* (Wohlsen et al, 2006) (Eisgruber et al, 2003).

Si l'identification de l'espèce *Clostridium perfringens* est peu pratiquée en routine, la recherche des souches entérotoxigènes relève de l'exception. En effet, compte tenu des difficultés rencontrées pour mettre en évidence l'entérotoxine de *Clostridium perfringens*, aucun laboratoire de microbiologie alimentaire ne peut détecter en routine les souches productrices qui sont, d'après les quelques données épidémiologiques, responsables de Toxi-infections alimentaires. Néanmoins, l'identification du caractère entérotoxigène des souches peut être réalisée à partir de cultures en phase de sporulation (milieu de Duncan et Strong). Pour cela, des milieux spéciaux de sporulation doivent être utilisés et la sporulation contrôlée par examen au microscope à contraste de phase ou par culture après étape de chauffage (80 °C pendant 10 minutes). La mise en évidence de l'entérotoxine est effectuée par recherche de son effet cytotoxique sur des cultures de cellules Vero ou par des méthodes immunologiques (ELISA, agglutination sur billes de latex, Immuno-diffusion). Plusieurs tests ont été décrits pour rechercher l'entérotoxine de *Clostridium perfringens* (Michel Frederighi, 2005).

2.2. Méthodes Moléculaires.

Ces méthodes ne permettent de détecter qu'une seule copie d'une séquence d'ADN cible. Par conséquent, elles peuvent être utilisées pour détecter une seule bactérie pathogène dans les aliments. Un ADN cible peut être amplifié 1-million de fois pendant une heure, Ainsi, parmi les méthodes largement préconisées on retrouve la Polymérase Chaîne Réaction ou PCR.

Une PCR multiplex permettant d'amplifier simultanément deux fragments dans le gène de la toxine α et de l'entérotoxine, a été mise au point. Le gène de la toxine α sert de marqueur pour l'espèce *Clostridium perfringens*, celle du gène de l'entérotoxine discrimine les souches entérotoxigènes.

La recherche de *Clostridium perfringens* dans les aliments peut se faire à partir de suspensions alimentaires en eau peptonée et incubées en anaérobiose pendant une nuit. Un échantillon de 1ml de la culture d'enrichissement est centrifugé et le culot bactérien est utilisé pour l'amplification par PCR. Ce protocole permet de détecter en 24 heures la présence du germe dans les aliments et d'identifier la présence de souches entérotoxigènes. Par contre, seule la méthode bactériologique classique permet d'isoler clairement *Clostridium perfringens* (Michel Frederighi, 2005).

VII. Principales pathologies dues à *Clostridium perfringens*.

Dans l'esprit de tous, le nom de *Clostridium perfringens* reste associé à des affections au pronostic redoutable, comme les gangrènes gazeuses ou les septicémies du post-abortum. En réalité et de nos jours, cette espèce est surtout responsable de maladies beaucoup moins graves, qu'il s'agisse d'intoxications alimentaires, d'infections tissulaires ou même systémiques. De plus, l'isolement de *Clostridium perfringens* dans des prélèvements effectués chez l'homme est fréquent et n'est pas une preuve de son rôle dans un processus pathologique, car cette espèce est largement répandue dans l'environnement et est présente à l'état commensal dans le tube digestif humain. Hormis *Clostridium perfringens*, près de trente espèces de *Clostridium* peuvent être isolées chez l'homme. Ces germes, dont l'habitat est souvent le même que celui de *Clostridium perfringens*, sont habituellement des agents de surinfection ou de simples contaminants. Certaines espèces, généralement productrices d'une ou plusieurs toxines létales, peuvent toutefois provoquer des infections proches de celles observées avec *Clostridium perfringens* (Carlyle Jones et al, 1997) (Berche et al, 1988).

1. Chez l'homme.

1.1. Les toxi-infections alimentaires.

Bien que la collecte des cas de toxi-infections alimentaires soit difficile, les résultats des analyses pratiquées pour ceux qui ont été effectivement enregistrés dans différents pays montrent que *Clostridium perfringens* est une cause fréquente d'intoxications alimentaires. (Berche et al, 1988).

1.1.1. Les intoxications alimentaires à *Clostridium perfringens* type A.

Dues le plus souvent au toxinotype A de *Clostridium perfringens*, les intoxications alimentaires surviennent habituellement par foyers épidémiques, touchant 50 à 70% des sujets d'une même collectivité ayant ingéré un aliment contaminé, souvent un mets à base de viande. Elles se manifestent par une diarrhée aqueuse et de douleurs abdominales à type de crampes épigastriques, auxquelles peuvent s'associer des nausées ou des vomissements, voir une fièvre modérée (Hans Riemann et Dean Cliver, 2006) (Berche et al, 1988). Les symptômes de la maladie apparaissent en général 8 à 12 h voire 6 à 24h, après ingestion d'un repas contaminé contenant de grandes quantités de

cellules végétatives de *Clostridium perfringens* type A entérotoxigène à raison de 10^6 à 10^7 cellules/g. Les symptômes observés sont en général bénins, et cette affection guérit spontanément en 2 à 3 jours. Toutefois, ces symptômes peuvent être plus sérieux chez des sujets peu résistants tels que les jeunes enfants et les personnes âgées, chez lesquels la déshydratation occasionnée par la diarrhée peut être importante (Bourgeois et al, 1996) (Hans Riemann et Dean Cliver, 2006)

Le traitement est le plus souvent symptomatique. La réhydratation est préconisée dans les formes sévères de déshydratation. L'antibiothérapie n'est pas recommandée, excepté dans les formes sévères. *Clostridium perfringens* est sensible à la plupart des antibiotiques, notamment aux Béta-lactamines, mais pas aux aminosides (Afssa, 2006) (Berche et al, 1988).

1.1.2. Les intoxications alimentaires à *Clostridium perfringens* type C.

Cette affection qui se traduit par une diarrhée souvent hémorragique et une nécrose de la paroi intestinale, sévit dans des populations habituellement végétariennes qui consomment occasionnellement des préparations de viande, principalement de porc, contaminées par des souches de type C. (Leclerc et al, 1999).

1.2. Les gangrènes gazeuses ou myonécrose clostridienne.

Clostridium perfringens et plus rarement d'autres *Clostridium* sont à l'origine de la gangrène gazeuse, maladie historique au pronostic toujours sévère malgré l'arsenal thérapeutique actuel. Cela ne doit pas faire oublier que ces mêmes espèces bactériennes déterminent de nombreux autres types d'infections tissulaires, dont l'évolution est habituellement favorable. Par ailleurs, quels que soient leur nature et leur aspect, les plaies sont fréquemment contaminées par des *Clostridium*, y compris *Clostridium perfringens*, souvent en association avec d'autres espèces bactériennes. Inversement, certaines infections tissulaires avec production de gaz peuvent être liées à la présence de germes n'appartenant pas au genre *Clostridium* (*Bacteroides*, entérobactéries). Il en résulte que le diagnostic d'infection tissulaire à *Clostridium* requiert la confrontation des données cliniques et bactériologiques (Berche et al, 1988).

La gangrène gazeuse débute généralement après une période d'incubation de 12 à 24 heures voire 6 heures à 6 jours. L'infection se manifeste localement par une douleur

souvent vive et d'intensité croissante, une peau froide et décolorée, un œdème tendu et ferme, un exsudat peu abondant d'odeur nauséabonde et un début de crépitation palpable. Dès ce stade, une radiographie des parties molles peut objectiver la présence de gaz au sein même des masses musculaires. Le diagnostic est assuré par les examens bactériologiques et les constatations per-opératoires. Des bacilles à Gram positif type *Clostridium* sont retrouvés à l'examen direct des frottis d'exsudat, tandis que l'on note l'absence caractéristique de cellules inflammatoires. L'intervention chirurgicale doit être effectuée en urgence. Les muscles atteints apparaissent pâles et œdématiés, ne se contractent pas sous la pince, et ne saignent pas franchement quand ils sont incisés. Après quelques heures d'évolution, ils prennent une coloration brunâtre ou noirâtre et un aspect gélatineux caractéristique, avec présence de bulles de gaz. C'est surtout à ce stade tardif que sont présents les signes généraux de toxémie, de mauvais pronostic : hypotension, troubles mentaux avec agitation puis obnubilation, fièvre ou plus rarement hypothermie, insuffisance rénale. Des hémocultures positives à *Clostridium* sont alors retrouvées dans 5 à 10 % des cas. L'évolution des gangrènes gazeuses est habituellement sévère, surtout en cas d'atteinte abdomino-pelvienne, de traitement chirurgical tardif, et lorsqu'il existe une pathologie sous-jacente (diabète, carcinome colique). La mort survient dans 40 à 60 % des cas, par défaillance circulatoire irréductible ou troubles neurologiques profonds. La guérison, quand elle est obtenue, se fait parfois au prix de graves séquelles fonctionnelles (Berche et al, 1988), (Moselio Schaechter, 2004).

2. Chez l'animal : L'entérotoxémie.

L'entérotoxémie est un processus pathologique aigu, très souvent fatal à allure enzootique, atteignant de nombreuses espèces animales, notamment les petits ruminants et caractérisé par la diffusion dans le sang de toxines secrétées dans le tractus intestinal. *Clostridium* est considéré comme le principal agent étiologique de cette maladie, en particulier *Clostridium perfringens*. Les entérotoxémies constituent incontestablement la cause majeure de mort subite. Le syndrome débute à la faveur d'une rupture de l'équilibre de la flore intestinale. La prolifération des clostridies qui en résulte, s'accompagne d'un accroissement de la concentration en toxines dans l'intestin. La dégradation et l'augmentation de la perméabilité de la paroi digestive par ces toxines

se solde par une diarrhée profuse et la toxi-infection du sujet (Philippeau et al, 2003) (Vallet, 2000).

Sur le plan clinique, nous distinguons deux formes :

2.1. La forme suraiguë.

Il s'agit de la forme la plus classique, l'évolution clinique est généralement inférieure à 24 heures (Briot, 2009). Trouver un ou plusieurs animaux morts est souvent le premier signe d'entérotoxémie suraiguë dans un troupeau. Les signes cliniques comprennent une soudaine perte d'appétit, un abattement marqué, des douleurs abdominales se caractérisant par un dos courbé, des coups portés à l'abdomen, des cris de plainte et une diarrhée aqueuse, profuse contenant du sang et des flammèches de mucus. Des hyperthermies jusqu'à 40,5°C ont également été rapportées. Les animaux touchés deviennent rapidement faibles et restent couchés. Ils peuvent présenter des crises de convulsions mais la plupart du temps ils tombent dans le coma sans signes annonciateurs. La mort suit en général en quelques heures (Vallet, 2000) (Glock et al, 1998).

2.2. La forme aiguë.

Des signes cliniques de même nature sont observés avec une gravité inférieure. La douleur abdominale et les plaintes sont réduites voire absentes. Les fèces deviennent pâteuses puis molles avant de devenir aqueuses. La maladie évolue sur trois à quatre jours. Une déshydratation importante et une acidose sont des complications dans ce cas de figure, à cause de la diarrhée profuse.

Des signes nerveux se manifestent par des grincements de dents, des mouvements de pédalage, opisthotonos, du ptyalisme, une hyperesthésie et des pertes connaissances et des convulsions intermittentes tonico-cloniques (Lefevre et al, 2003).

Les lésions observées sont différentes selon l'âge de l'animal et le type de *Clostridium* responsable. L'autopsie doit être réalisée dans les 12 heures qui suivent la mort afin de pouvoir réaliser les prélèvements pour confirmer le diagnostic (Greenham et al, 1987).

A l'examen externe du cadavre, des lésions d'autolyse apparaissent très vite : distension abdominale due à des gaz accumulés dans les estomacs et les intestins, peau de couleur bleuâtre notamment au pli de l'aîne, écoulement spumeux et hémorragique sortant parfois des naseaux (Autef, 2007).

A l'ouverture du cadavre, les lésions rencontrées lors d'une entérotaxémie sont rapportées dans le tableau IV ci-après :

Tableau IV : Lésions rencontrées lors d'une entérotaxémie.

Carcasse	Putréfaction rapide, bon état d'engraissement, belle conformation, muqueuses parfois ictériques
Cavités abdominales et Thoraciques	Epanchement séro-hémorragique péritonéal et péricardique
Caillette	Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique
Intestin grêle	Muqueuse congestionnée, parfois hémorragique voire nécrotique Contenu intestinal liquide séro-hémorragique
Foie	Congestionné, friable, décoloré et hypertrophié
Rein	Congestion de la corticale Pétéchies, hémorragies sous-capsulaire, « Reins pulpeux » (ovin)
Cœur	Pétéchies, Suffusions Péricardiques. Endocardiques, Myocardiques.
Poumon	CÈdème, congestion active
Ganglions	Adénite congestive, œdémateuse ou hémorragique

La photo n° 06 montre le cas de congestion hémorragique intestinale observée lors d'une entérotoxémie.



Photo 06: Congestion hémorragique intestinale observée lors d'entérotoxémie (Briot, 2009).

La photo n° 07 montre le cas d'un Rein mou et fluctuant (A) lors d'entérotoxémie et d'un Rein normal (B) chez un bovin.

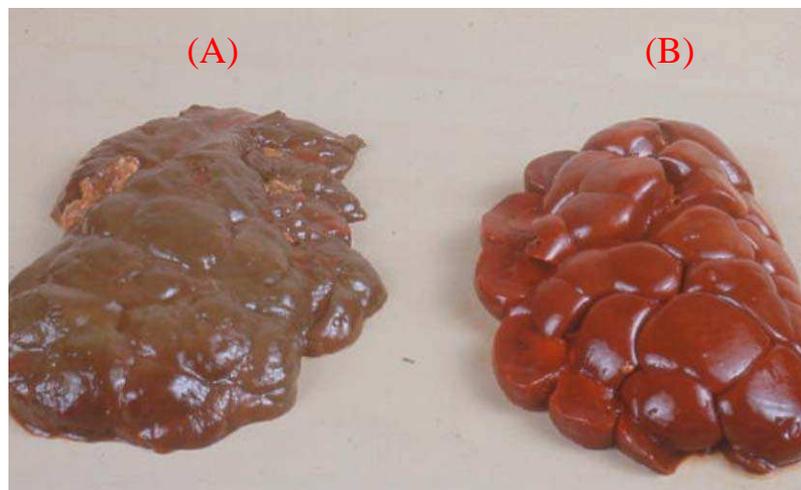


Photo 07: Rein mou et fluctuant (A) lors d'entérotoxémie et rein normal (B) chez un bovin (Peyre, 2009)

CHAPITRE II

TECHNOLOGIE DU LAIT

I. Définitions.

1. Le Lait.

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β -carotènes. Il a une odeur peu marquée, mais caractéristique. Son goût, variable selon les espèces animales, est agréable et douceâtre.

En 1909, le lait destiné à l'alimentation humaine a été défini par le Congrès International de la Répression des Fraudes, comme étant «le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne doit pas contenir de colostrum». (Goursaud, 1985) (Tamime, 2009).

2. Le lait pasteurisé.

La dénomination « lait pasteurisé » est réservée au lait :

- a) Obtenu par un traitement mettant en œuvre une température élevée pendant un court laps de temps (au moins 72°C pendant quinze secondes ou toute combinaison équivalente) ou par un procédé de pasteurisation utilisant des combinaisons différentes de temps et de température pour obtenir un effet équivalent ;
- b) Immédiatement refroidi après pasteurisation pour être ramené, dans les meilleurs délais, à une température ne dépassant pas 6°C;
- c) Présentant une réaction négative au test phosphatase (Carole Vignola, 2002).

3. Le lait stérilisé.

La dénomination « lait stérilisé » est réservée au lait préalablement conditionné dans un emballage hermétique, puis chauffé pendant 15 à 20 minutes à une température de 115-120°C afin de détruire tous les germes susceptibles de s'y développer. Le lait est ensuite rapidement refroidi (Tamime, 2009).

Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert (Anonyme, 2009)

4. Le lait stérilisé UHT.

Le procédé dit d'Ultra Haute Température est également un procédé de longue conservation qui permet d'écourter le temps de chauffage : les qualités gustatives du lait sont mieux préservées qu'avec la stérilisation simple. Il s'agit de porter rapidement le lait à la température de 135°C minimum pendant 2 à 4 secondes, puis de le conditionner dans une ambiance stérile.

Le lait UHT peut être entier, demi-écrémé ou écrémé. On le trouve dans le commerce sous le nom « lait stérilisé UHT ». Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert (James Jay et al, 2005).

5. Le Lait en poudre.

Selon l'arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 (JORADP) relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation :

On entend par lait en poudre ou lait déshydraté ou lait sec, le produit solide obtenu directement par élimination de l'eau du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini. Le lait en poudre se présente sous l'aspect d'une poudre blanche ou légèrement crème, homogène ne contenant pas d'impuretés, de grumeaux ni de parcelles colorées. Il est franc d'odeur et de saveur (Codex Alimentarius, 1999).

Les laits en poudre sont commercialisés en dosettes de 19 g, en boîtes de 125g, 250g, 500g et 1 kg, et en sacs de 1, 5, 10 et 25 kg.

Cette déshydratation presque totale permet au lait en poudre de se conserver à température ambiante. Cependant, il craint la chaleur et l'humidité. Il doit être utilisé ou consommé immédiatement après avoir été reconstitué par adjonction de liquide.

On distingue les laits en poudre suivants:

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.

- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.
- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses. (Anonyme, 2009).

II. Différents procédés de conservation et de stabilisation du lait.

1. Historique.

L'industrie des laits déshydratés débute de l'époque de Marco Polo dans le 13^{ème} siècle. Il est rapporté que Marco Polo a séché au soleil, le lait de ses voyages à travers la Mongolie et que, à ce début, les produits laitiers secs ont évolué, jusqu'à l'aire des scientifiques pionniers, tels qu'APPERT et GAIL BORDEN en 1856. Les méthodes de base ont été élaborées par l'émergence des processus de séchage des produits laitiers. EKENBERG et MERRILL ont été reconnus en qualité de premiers développeurs des systèmes rouleaux et séchage spray, aux États-Unis. Des formes grossières de lait sec ont été préparées depuis des siècles dans les pays orientaux, mais le lait en poudre est essentiellement un produit de la technologie du XX^{ème} siècle (Elmer Marth et James Steele, 2001) (Sloth et *al*, 1990).

Au début du XX^{ème} siècle, la majeure partie du lait sec était produite par séchage sur cylindres et par d'autres procédés maintenant périmés, mais depuis 1930 la dessiccation par atomisation n'a cessé de gagner en extension. Cette tendance s'est considérablement accélérée dans de nombreux pays pendant la seconde guerre mondiale, pour répondre aux besoins des forces armées. Par la suite, elle s'est encore accusée en raison de l'augmentation de la production laitière particulièrement lors des périodes saisonnières de production excédentaire. Divers procédés commerciaux de fabrication ont été successivement adoptés puis abandonnés (Crossley, 1966). Les techniques les plus utilisées actuellement sont : séchage sur cylindres, dessiccation par atomisation et la lyophilisation (Hui et *al*, 2008) (Tamime, 2009).

2. Procédés de fabrication de lait en poudre.

Après la traite et dans le but d'une part, de conserver le plus longtemps possible le lait et d'autre part, de permettre sa commercialisation la plus lointaine possible dans des conditions idéales, différents procédés de conservation et de stabilisation ont été proposés depuis de longues années (Tamime, 2009).

Parmi les traitements thermiques des produits laitiers, on trouve le séchage, qui consiste à chauffer le produit dans des conditions contrôlées afin d'évaporer la majorité de l'eau qu'il convient. Il se produit deux phénomènes simultanés : le transfert de chaleur qui apporte l'énergie nécessaire à la transformation de l'eau en vapeur et le transfert de vapeur d'eau dans le produit laitier. Il y a plusieurs types de séchage, parmi lesquels le séchage sur rouleaux, le séchage sur lit fluidisé et le séchage par atomisation (Jeantet et al, 2001) (Crossley, 1966).

2.1. Séchage sur cylindres.

Appelé également et communément procédé « Hatmaker » ou à tambours, c'est le plus ancien des procédés commerciaux satisfaisants; il n'a guère évolué depuis le début du siècle. Essentiellement simple, il consiste à chauffer un mince film de lait pendant 2 à 3 secondes sous une pression atmosphérique sur une surface métallique chauffée par de la vapeur à 143°-149°C (Sloth et al, 1990).

Le dispositif courant est formé de deux cylindres (ou rouleaux) parallèles, disposés à 0,50 à 0,75 mm l'un de l'autre et chauffés par de la vapeur. Des plaques disposées au-dessus des cylindres forment un bac dans lequel on introduit le lait, Les cylindres sont généralement faits de fonte polie, ou dans certains appareils, d'acier inoxydable (Crossley, 1966) (Figure 01).

Le Lait coule du bac entre les cylindres en rotation et forme un film sur les surfaces chaudes; il sèche complètement en un demi-tour. Un couteau racleur disposé au-dessus de chaque cylindre décolle le film sec en une mince feuille continue qui est recueillie et entraînée par une vis convoyeuse vers des tamis et des broyeurs. Le lait qui alimente les cylindres est habituellement préchauffé à une température qui n'excède pas 71°C. Au-dessus de 71 °C l'ensemble du traitement thermique devient excessif et donne une

poudre de qualité inférieure sans pour autant améliorer sensiblement la vitesse de séchage (Crossley, 1966).

Le séchage sur cylindres présente quelques caractéristiques intéressantes:

- Les immobilisations en capital et les frais d'exploitation sont peu élevées.
- La pré-concentration dans un évaporateur sous vide n'est pas indispensable.
- La méthode est économique même pour le traitement de petites quantités de lait.
- L'installation est mobile, peu encombrante et ne nécessite pas un local spécial.
- Le traitement thermique détruit la majorité des bactéries présentes dans le lait, de sorte que la poudre ne contienne que très peu ou pas de micro-organismes résiduels.

Tous ces avantages comptent beaucoup dans les pays peu développés où la production laitière est limitée ou sujette à des variations saisonnières marquées (Mahaut et al, 2000).

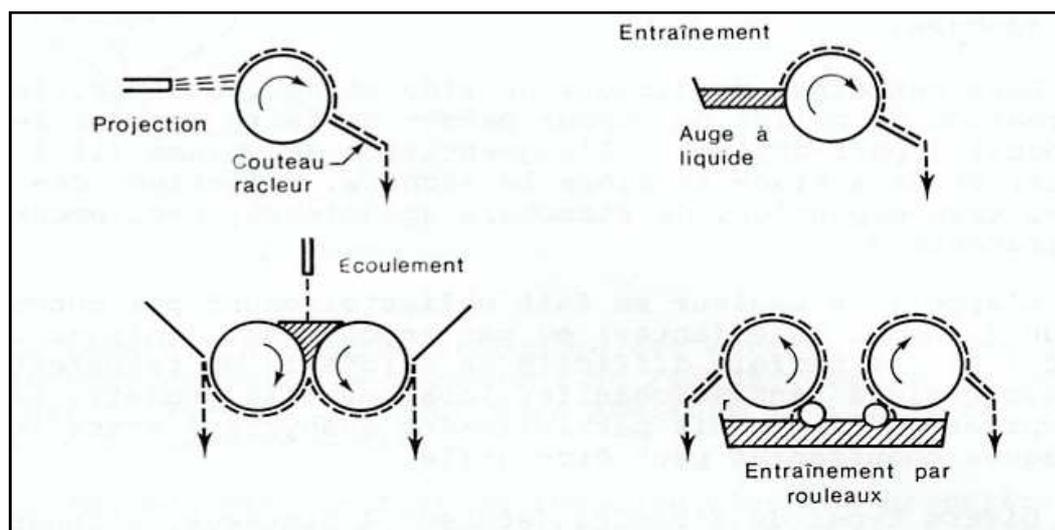


Figure 01 : Procédé de séchage sur cylindres (Cheftel et al, 1977).

2.2. Séchage par atomisation.

Appelé aussi procédé Spray ou par pulvérisation. Contrairement au séchage sur cylindres, la dessiccation par atomisation exige des installations complexes et encombrantes qu'il faut loger dans des bâtiments spéciaux. Les immobilisations en capital sont élevées et le procédé est d'autant plus économique que les quantités de lait

traitées sont plus grandes. La poudre de lait obtenue par atomisation est nettement supérieure au produit du séchage sur cylindres tant en arôme et aspect qu'en solubilité, mais son prix de vente est plus élevé. Elle a pris une importance internationale considérable dans les industries laitières nouvelles comme dans les anciennes et permet un appoint alimentaire essentiel des régimes insuffisants dans les pays où la malnutrition est fréquente (Mahaut *et al*, 2000) (Jeantet *et al*, 2001).

Le principe de base consiste à pulvériser le lait en un brouillard de très fines gouttelettes qu'on envoie dans une vaste enceinte où elles sont mélangées à un courant d'air chaud. Leur surface étant relativement considérable, elles se transforment presque instantanément en une poudre fine que l'on soustrait alors au courant d'air chaud et de vapeur d'eau.

Au total, ce procédé comprend trois opérations distinctes mais interdépendantes (Carole Vignola, 2002) (Figure 02).

➤ **Le préchauffage du lait cru :**

Le préchauffage est indispensable pour détruire les bactéries et inactiver les ferments dont peuvent être chargés les approvisionnements laitiers. La dessiccation par atomisation n'assure pas la destruction totale des germes pathogènes et c'est pourquoi le préchauffage est nécessaire. Le traitement doit donc au minimum être équivalent à une pasteurisation normale de l'ordre de 73° à 74°C pendant 1 à 3 minutes, donnant un produit qui satisfasse aux épreuves types de contrôle, notamment à celle de la phosphatase. Au cours des dernières années a été mis au point un système de préchauffage à très haute température de l'ordre de 110 à 149°C pendant quelques secondes qui permet d'obtenir un produit quasi-stérile et surtout dépourvu de spores.

➤ **La concentration :**

L'atomisation n'est pas un traitement thermique très efficace car la chaleur fournie à l'air qui sert au séchage n'est que partiellement utilisée. Sous ce rapport, l'évaporateur sous vide est plus efficace et moins encombrant. Il est donc avantageux d'éliminer ainsi une partie de l'eau la pré-concentration est réalisée au moyen d'un des types d'évaporateurs sous vide utilisés en laiterie.

➤ **La dessiccation par atomisation du lait concentré :**

Le lait concentré est extrait de l'évaporateur par un dispositif barométrique ou par pompage et envoyé dans un ou plusieurs bacs bascules alimentant l'atomiseur. Le lait concentré est introduit au sommet de la tour d'atomisation. Il est alors "atomisé" (transformée en aérosol ou brouillard) au moyen d'une turbine d'atomisation ou par injection à haute pression au travers de buses. Les petites gouttes liquides ainsi formées sont entraînées et déshydratées par un courant d'air chaud. Les gouttelettes sont séchées en une poudre sèche avant de tomber sur les parois inférieures de l'appareil. La séparation poudre-air humide est effectuée à l'aide de séparateurs cyclones (Cheftel *et al*, 1977) (Mahaut *et al*, 2000).

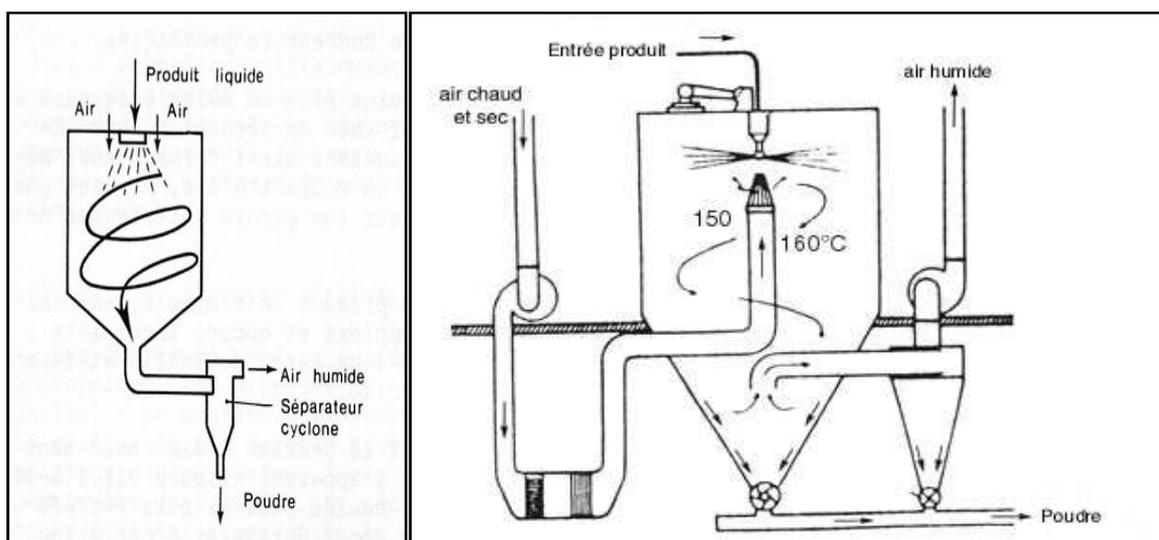


Figure 02 : Procédé de séchage par atomisation (Cheftel *et al*, 1977).

III. Microbiologie du lait en poudre.

Du fait de sa composition physico-chimique, le lait cru est un excellent substrat pour la croissance microbienne. Il contient en principe peu de micro-organismes, lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 5000 germes/ml et moins d'un coliforme/ml). Ce sont des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. D'autres germes peuvent être présents dans le lait notamment lorsqu'il est issu d'un animal malade (agents de mammite) (Kamelia *et al*, 2010). Le lait peut également être

contaminé au cours de la traite et des diverses manipulations par une multitude de micro-organismes (Larpent, 1996).

Toutefois, il faut éviter que de nombreux micro-organismes ne survivent dans le lait en poudre, particulièrement lorsqu'il est destiné à des usages tels que l'alimentation des enfants ou la fabrication des crèmes glacées, car la prolifération des germes peut être rapide une fois que le lait a été reconstitué. Le traitement thermique sévère imposé par le séchage sur cylindres réduit généralement la population bactérienne à moins de 1000 germes par gramme (principalement des spores résistantes). Les principales sources de contamination sont la poussière et les opérations de conditionnement ou autres qui suivent la dessiccation. La poudre obtenue par atomisation constitue un produit bactériologiquement beaucoup plus variable; sa population bactérienne peut aller de 10 à plusieurs millions de micro-organismes par gramme de poudre. La flore du lait sec est surtout composée de micro-organismes thermorésistants (James Jay et al, 2005).

Les principaux groupes de ces germes sont les suivants:

- Microcoques thermorésistants fréquents dans les approvisionnements laitiers et difficiles à éliminer complètement du matériel et des installations laitières;
- Streptocoques thermorésistants, en particulier souches de *Str. thermophilus*, *Str. bovis*, *Str. faecalis* et *Str. Liquefaciens*;
- Corynébactéries dont la fréquence est très variable. Les souches thermorésistantes proviennent des approvisionnements laitiers et ne semblent pas dues à un manque d'efficacité dans le nettoyage des installations;
- Des spores bactériennes (surtout des spores d'espèces aérobies telles que *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* et anaérobies telles que *Clostridium perfringens*) se trouvent dans presque toutes les poudres, à moins que le lait n'ait été soumis à un traitement à très haute température (James Jay et al, 2005). (Crossley, 1966).

IV. Le barème de stérilisation.

Le concept de stérilisation est utilisé lorsque l'on vise expressément l'inactivation des formes microbiennes les plus résistantes, c'est-à-dire les spores bactériennes, à commencer par les spores des bactéries pathogènes essentiellement les anaérobies. La notion d'inactivation recouvre une inaptitude définitive à se multiplier. Les produits stérilisés, à condition d'être à l'abri des recontaminations, sont stabilisés et se conservent à la température ambiante. Ces produits sont dénommés conserves appertisées, du nom de Nicolas Appert qui breveta leur procédé de fabrication en 1810 (Bourgeois et *al*, 1996).

Si les formes végétatives des bactéries sont en général inactivées par un chauffage de 50 à 60 °C durant 30 minutes, les formes sporulées sont au contraire, et par nature, extrêmement thermorésistantes. Dans la plupart des cas, seule une température supérieure à 100 °C pendant un temps de contact de plusieurs dizaines de minutes assurera leur disparition. Ce couple « temps-température » réponds à la définition propre du « Barème de Stérilisation ». A une température constante donnée, suffisante pour exercer un effet destructeur, une population microbienne donnée décroît en fonction du temps de traitement thermique (MEYER et *al*, 2004). La décroissance est exponentielle comme le montre la courbe N dans la figure 03.

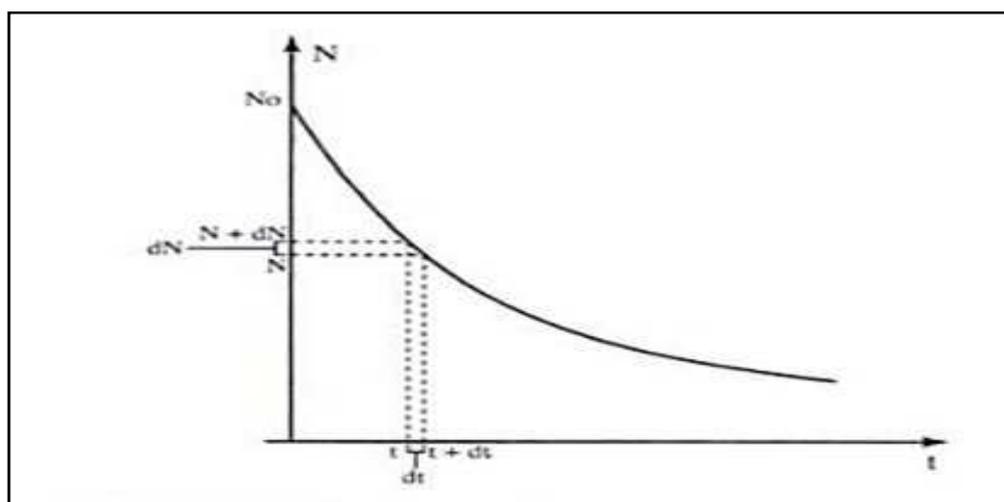


Figure 03 : Cinétique de l'inactivation (Anonyme, 1998).

Le Barème de stérilisation est défini par une température et un temps de stérilisation. Ce sont les deux paramètres que l'on règle sur l'autoclave. Par exemple 115 °C pendant 60 minutes.

Le barème s'établit en fonction :

- de la nature du produit,
- de l'emballage,
- du nombre de micro-organismes contenus dans le produit avant stérilisation. C'est-à-dire la charge microbienne initiale.
- du type de stérilisation employé et du délai de mise de régime de traitement (temps nécessaire pour atteindre la température de stérilisation).

Il n'existe pas un seul et unique barème pour un produit. Pour un même stérilisateur, une infinité de barèmes peuvent être appliquées. Ceci pose fréquemment le problème du choix du barème : faut-il privilégier une température modérée ou au contraire un temps de stérilisation court.

Il faut noter également que le choix de la température de stérilisation influe très largement sur les qualités organoleptiques des produits, car si la chaleur détruit les microorganismes, elle altère par la même occasion également le goût, la texture, la présentation et la valeur nutritive des aliments. Par exemple, une trop forte stérilisation du lait entraîne l'apparition d'un goût de brûlé et une couleur plus foncée par exemple la caramélisation du lactose (Anonyme, 1998).

Les deux composants du Barème de stérilisation à savoir le temps et la température sont nécessaires pour atteindre la stérilisation commerciale. A titre d'exemple pour le lait, on peut chauffer pendant 5 minutes à 110 °C ou 3 secondes à 130 °C.

Dans la pratique industrielle, la température du produit varie pendant le traitement et de façon différente en chaque point du produit. Pour calculer les barèmes de stérilisation, c'est-à-dire le couple temps-température nécessaire à l'obtention de la stérilité biologique du produit, il faut connaître les variations de température dans le produit au cours du temps. Dans la pratique, on suit la température au point le plus froid du produit, appelé « point critique ». Toutefois, ceci n'est qu'une approximation qui

dépend du produit et des caractéristiques géométriques du récipient. La mesure des variations de température au point critique est réalisée, en fonction du temps, par exemple, avec des thermocouples reliés à des millivoltmètres puis à des potentiomètres enregistreurs (Bourgeois et *al*, 1996).

Par ailleurs, dans la figure n° 03 ci-avant, on a bien noté que la courbe N exprimant la décroissance bactérienne est une courbe exponentielle. De ce fait, et étant donné que cette courbe ne franchit jamais l'axe des abscisses, on peut conclure qu'il y a destruction de 99 % de la flore bactérienne éventuellement présente dans le produit, ce qui nous force à admettre d'une part, qu'il s'agit là d'une stérilité commerciale prenant en considération le maintien des caractères organoleptiques et d'autre part, la persistance de quelques rares spores dans quelques rares échantillons. Par contre, dans le cas d'une stérilité biologique, la courbe N franchit aisément l'axe des abscisses comme le montre la figure n° 04 ci-après, et se traduit par la destruction totale de toute la flore microbienne éventuellement présente y compris les spores, mais dans ce cas très souvent il s'agit de produits « brulés » avec atteinte profonde des caractères organoleptiques.

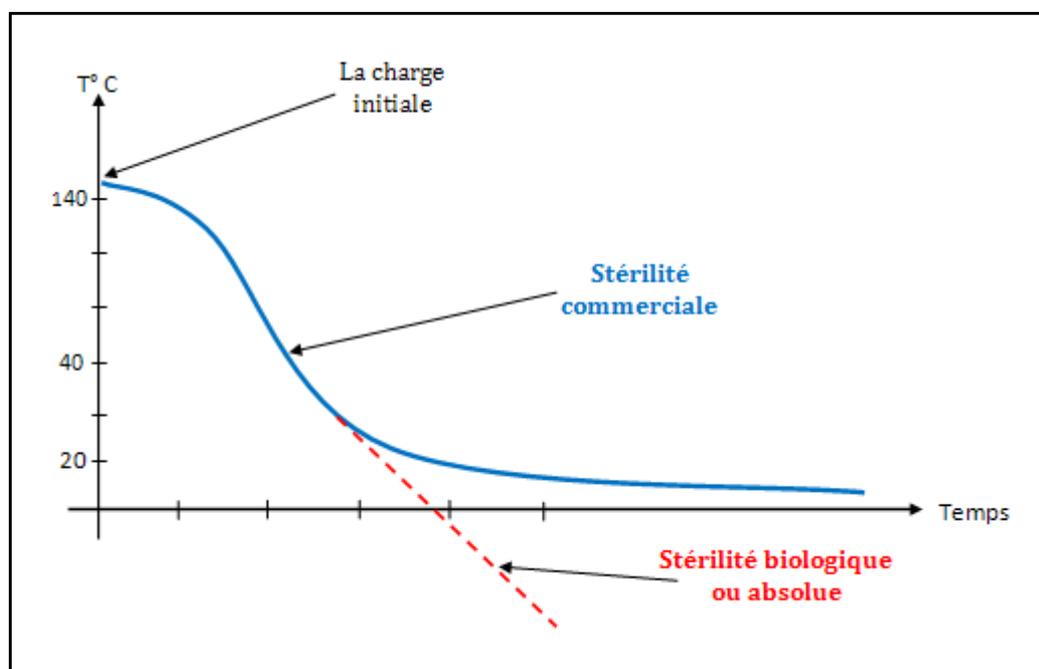


Figure 04 : Courbe exponentielle. « temps-température » (Anonyme, 1998).

PARTIE

EXPERIMENTALE

OBJECTIFS :

Au début de notre travail, nous nous sommes fixés trois principaux objectifs :

1. Mise en place de la technique de recherche et de dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les poudres de lait d'importation au niveau du Laboratoire d'Hygiène et d'Inspection des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDA OA) de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach.
2. Evaluation du degré de contamination (qualitatif et quantitatif) des poudres de lait utilisées en l'état aussi bien en industrie laitière qu'en état de consommation directe après reconstitution.
3. Interprétation de nos résultats en fonction de la réglementation nationale fixant les spécifications microbiologiques des poudres de lait.

Nous avons effectué notre travail au niveau du Laboratoire d'Hygiène et d'Inspection des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (HIDA OA) de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'El Harrach durant la période allant de Décembre 2009 à Juin 2010.

I. Matériel.

1. Milieux de culture et réactifs.

- Gélose Tryptose Sulfite à la Cyclosérine (TSC), exempte de jaune d'œuf. (IPA)
- Solution de D-Cyclosérine. (Sigma-Aldrich).
- Milieu Thioglycolate Liquide. (IPA)
- Milieu Lactose Sulfite. (IPA)
- Tryptone Sel Eau. (IPA)
- Solution de Métabisulfite de sodium. (Biochem-Chemopharma)
- Solution de Citrate de fer (III) ammoniacal. (Riedel-De Haën).
- Huile de paraffine. (Sigma-Aldrich).
- Colorants de Gram (Violet de Gentiane, Lugol, Fushine). (IPA)
- Alcool.
- Eau distillée stérile. (IPA)

Les formules des milieux de culture utilisés dans le cadre de la présente norme se trouvent en annexe I.

2. Matériel de laboratoire.

Le matériel utilisé est le matériel usuel d'un laboratoire de microbiologie alimentaire à savoir :

- Etuves (30, 42 et 46°C)
- Bain Marie.
- Balance analytique.
- pH mètre.
- Compteur de colonies.
- Microscope optique binoculaire.
- Jarre d'anaérobiose.
- Générateurs d'anaérobiose. (GENbox anaer, bioMérieux).

3. Echantillonnage.

La taille de l'échantillonnage d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de 5 unités. Le laboratoire doit disposer d'environ 500g de produit, soit 5 fois 100g. Si le prélèvement de 5 échantillons s'avère trop élevé par rapport à la production il est procédé à un étalement dans le temps des prélèvements. Ces prélèvements doivent avant tout respecter des règles d'asepsie et de représentativité (Jean-Louis CUQ).

La commission internationale des normes microbiologiques relatives aux denrées alimentaires (ICMSF) a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires. Le principe de base est le suivant : un échantillon analysé donne des résultats non satisfaisants s'il renferme des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle il devient potentiellement dangereux.

Dans cette méthode et avec un plan d'échantillonnage à deux classes le symbole **m** représente la limite permettant de répartir les échantillons en deux groupes :

- les acceptables pour lesquels la valeur est $\leq m$.
- les inacceptables pour lesquels la valeur est $> m$.
- Pour des microorganismes dangereux la valeur **m** peut être égale à 0.

Le symbole **n** représente le nombre d'échantillons examinés. Pour ce plan il existe deux possibilités : utiliser la notion de présence ou absence pour déterminer la tolérance ou non des numérations supérieures à la valeur critique **m**. (Codex Alimentarius, 1997).

Le symbole **c** représente le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil, nombre qui permet de juger le lot comme satisfaisant (Critère d'acceptation du lot).

Dans la pratique, et pour faciliter l'interprétation des résultats nous nous sommes basés sur l'arrêté interministériel N° 35 du 27 Mai 1998 publié dans le JORADP, fixant les spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires. Ce dernier préconise le plan suivant : **n=5**, **c=0** et **m=absence**.

Au total nous avons prélevé 200 échantillons de poudre de lait d'importation répartis comme suit :

- Cent échantillons sont effectués sur des poudres de lait d'importation à usage industriel à partir de deux laiteries (Laiterie fromagerie de Boudouaou et la Laiterie de Birkhadem).
- Cent échantillons de poudre de lait d'importation à usage direct après reconstitution provenant de différents commerces de détail et de grossistes de la wilaya d'Alger et Blida.

La répartition des 200 échantillons figure dans le tableau V ci-après.

Tableau V : Répartition des prélèvements en fonction de leur nature.

Nature des produits	Nombre de prélèvements	Volume des prélèvements
Poudre de lait d'importation à usage industriel	100	5 X 100 gr par sac de 25 Kg
Poudre de lait d'importation à usage direct après reconstitution	100	5 boîtes par lot
Total	200	

Tous les échantillons de poudre de lait d'importation à usage industriel ont été prélevés à partir des sacs de 25 Kg à raison de Cinq fois 100 gr dans Cinq pots stériles différents comme le stipule l'arrêté interministériel n° 35 du 27 Mai 1998, durant la période allant du mois de décembre 2009 au mois de Juin 2010. Chaque échantillon porte les différents renseignements techniques relatifs à la date de production, date de péremption, Nom ou raison sociale, adresse du fabricant ainsi que son origine (pays), codes, numéro de lots, teneur en matières grasses et poids nets (annexe II), Puis acheminés vers le laboratoire en vue des examens microbiologiques.

Pour des raisons pratiques, l'échantillonnage des lots a été programmé en fonction des arrivées des nouveaux lots dans les deux laiteries respectives et dans le but d'éviter toute contamination extérieure, nous avons :

- Procéder à la vérification de l'intégrité des sacs choisis (intactes et non ouverte) ;
- Désinfecter l'emballage externe avant le prélèvement proprement dit ;
- Travailler en champ stérile à l'aide d'une sonde métallique en inox spéciale, préalablement lavée et désinfectée par flambage.

Les photos suivantes montrent les différentes étapes des prélèvements.



Photos 08 : Les étapes du prélèvement (poudre du lait industriel)

Concernant les échantillons de poudre de lait de consommation directe après reconstitution, le choix des marques et des lots s'est fait sur la base des résultats d'une pré-enquête effectuée auprès des commerçants et des consommateurs sur les marques les plus demandées et sur la disponibilité des produits sur le marché.

Pour chaque lot nous avons prélevé aléatoirement Cinq boîtes ayant les mêmes dates de fabrication et le même numéro de lot, conservées à température ambiante, à l'abri de l'humidité puis acheminés au laboratoire.

II. Méthode.

Durant notre travail, nous avons utilisé la méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les poudres de laits destinés soit à usage industriel ou à la consommation humaine directe après reconstitution. Cette méthode est décrite dans la norme AFNOR NF V 08-056.

Méthode NF V 08-056 relative au dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les denrées alimentaires.

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens* dans toutes les catégories de denrées alimentaires y compris dans les poudres de lait.

Cette méthode est divisée en deux grandes étapes, d'abord l'analyse bactériologique proprement dite puis la confirmation biochimique et le dénombrement.

1. Principe.

La recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens* nécessitent les étapes suivantes.

2. Objet et domaine d'application.

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens* dans toutes les catégories de denrées alimentaires.

- On entend par dénombrement de *Clostridium perfringens* : détermination du nombre de bactéries revivifiables et confirmées par gr d'échantillon lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente norme.
- On entend par *Clostridium perfringens*, des colonies noires présentes dans le milieu sélectif spécifié et qui donnent des réactions de confirmation positives lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente norme.

3. Référentiels.

- Norme XP V 08-061 relative au Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfito-réductrices par comptage des colonies à 46°C. Méthode de routine.
- Norme NF V 08-056 relative au dénombrement des *Clostridium perfringens* par comptage des colonies.
- Norme NF V 08-019 relative à la recherche des *Clostridium perfringens*. Méthode par comptage des colonies.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la Compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.
- Norme ISO 7218 relative aux prescriptions générales concernant la Compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

4. Technique d'analyse proprement dite.

➤ **Première étape : Analyse bactériologique.**

Par cette méthode, les bactéries de *Clostridium perfringens* sont recherchées et dénombrées dans toutes les catégories de denrées alimentaires, selon le protocole suivant, comme le montre le logigramme ci-après.

Ensemencement en profondeur dans une boîte de pétri vide à l'aide d'une quantité déterminée soit 1 ml de la suspension mère (dans le cas des produits solides) du milieu gélosé Tryptose Sulfite à la Cyclosérine (TSC) préalablement fondu, refroidi et maintenu à 47°C et exempt de jaune d'œuf,

- Après solidification sur paillasse, procéder au recouvrement avec une couche du même milieu d'environ 10 ml.
- Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes à l'aide des dilutions décimales suivantes, soit 10^{-2} et 10^{-3} .
- Incubation des boîtes à 37°C en anaérobiose pendant 20 ± 2 heures, une incubation de plus longue durée pourrait aboutir à un noircissement des boîtes.
- Numération des colonies noires caractéristiques, visibles sur les boîtes, en prenant en considération les boîtes contenant moins de 150 colonies.

➤ **Deuxième étape : Epreuve de confirmation à partir des colonies caractéristiques.**

Transférer à l'aide d'une pipette Pasteur stérile munie d'une petite poire, 1 à 3 colonies caractéristiques sur 1 à 3 bouillons tubes contenant du bouillon Thioglycolate désaéré. Paraffiner puis incuber à 37°C pendant 20 ± 2 heures en anaérobiose.

- Repiquer 5 gouttes de chacune des cultures des bouillons Thioglycolate sur bouillon LS (Lactose Sulfite) muni d'une cloche de Durham, désaéré puis additionné de 0,5 ml d'une solution de Métabisulfite de Sodium et de 0,5 ml d'une solution de Citrate de Fer Ammoniacal, à incuber à 46°C pendant 24 ± 2 heures dans un bain marie.
- Les colonies confirmées présentent une croissance avec production de gaz (1/3 de la cloche de Durham) et la présence d'un précipité noir au fond du tube correspondant au Sulfure de Fer produit par *Clostridium perfringens*.

Calcul du nombre de *Clostridium perfringens* par gr d'échantillon :

Pour chaque boîte, calculer la valeur **a** selon la formule suivante :

$$a = \frac{b}{A} * C$$

Où :

b : nombre de colonies caractéristiques répondant aux critères d'identification.

C : nombre total de colonies caractéristiques sur la boîte.

A : nombre de colonies caractéristiques repiquées.

a : nombre de *Clostridium perfringens* identifiés.

5. Lecture et interprétation. Expression des résultats :

Retenir les boîtes contenant au maximum 150 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies caractéristiques sur chacune des boîtes retenues pour le comptage des colonies.

Repiquer un nombre déterminé **A** (en général 3) de colonies caractéristiques sur chacune des boîtes retenues pour le comptage des colonies.

Après identification, calculer, pour chacune des boîtes, le nombre **a** de *Clostridium perfringens* identifiés selon l'équation précédente.

Arrondir à un nombre entier de colonies selon les règles suivantes :

- si le chiffre après la virgule est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié,
- si le dernier chiffre est supérieur à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.
- si le dernier chiffre est égal à 5, arrondir le chiffre précédent au chiffre pair le plus proche.

Calculer ensuite le chiffre **N** de *Clostridium perfringens* identifiés présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée, à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\sum a}{1,1 * d}$$

Où :

Σa : est la somme des colonies répondant aux critères d'identification sur les boîtes retenues.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs.

Noter comme résultats, le nombre par ml ou par gr de produit, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x où x est la puissance appropriée de 10.

Exemple :

Un dénombrement direct d'un produit a donné les résultats suivants :

- à la première dilution 10^{-1} retenue : 66 colonies.
- A la deuxième dilution 10^{-2} retenue : 5 colonies.

On a repiqué :

- pour 66 colonies, 3 colonies dont 2 ont répondues aux critères, d'où $a = 44$
- Pour 5 colonies, 3 colonies se sont révélées toutes être le micro-organisme recherché.

$$N = \frac{\Sigma a}{1,1 \times d} = \frac{44 + 5}{1,1 \times 10^{-1}} = 445$$

Le nombre de *Clostridium perfringens* recherchés dans l'échantillon pour essai est de **4,5 x 10² par gr de produit.**

6. Estimation des petits nombres de *Clostridium perfringens* :

➤ Si la boîte, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la Suspension mère (produit solide) **contient moins de 15 colonies**, exprimer le résultat de la façon suivante :

- pour les produits liquides : $N_e = a$
- pour les produits solides : $N_e = a/d$

Où :

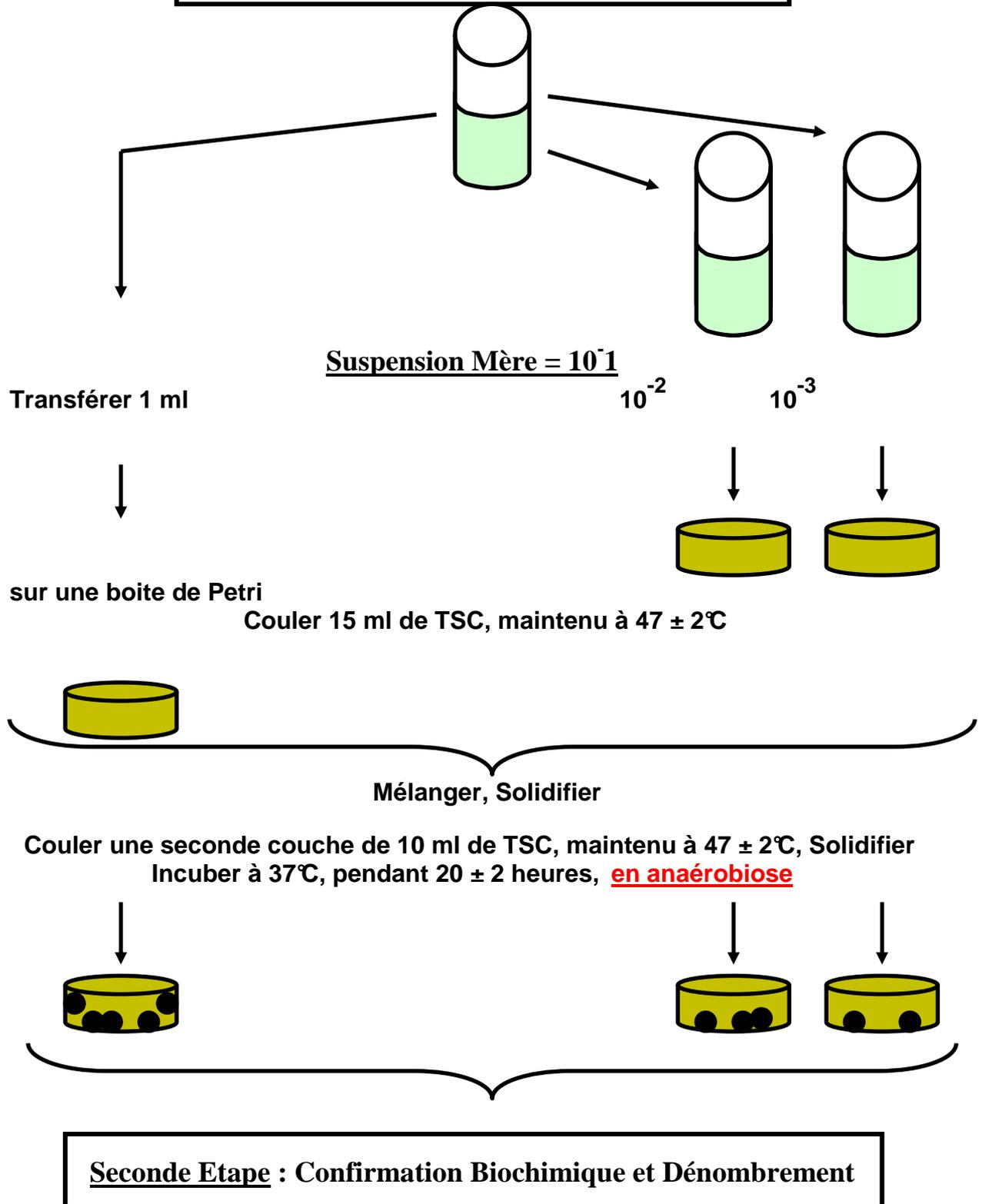
a : est le nombre de *Clostridium perfringens* identifiés.

d : est le taux de dilution correspondant à la suspension mère.

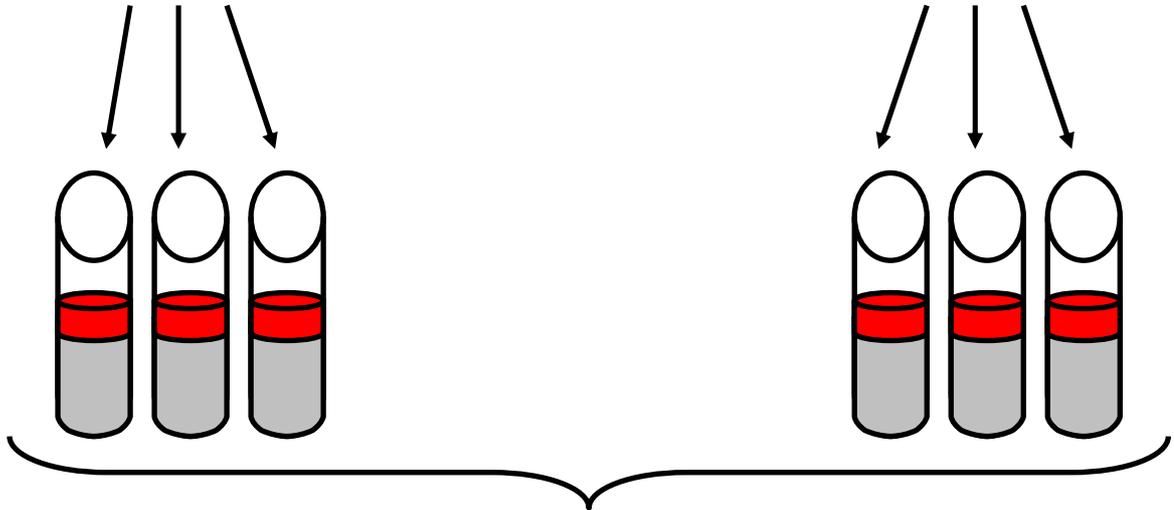
- Si la boîte, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (produit solide) **ne contient aucune colonie**, exprimer le résultat de la façon suivante :
- moins de 1 *Clostridium perfringens* par ml pour les produits liquides.
 - Moins de 1/d *Clostridium perfringens* par gr pour les produits solides

Où :

d : est le taux de dilution correspondant à la suspension mère.

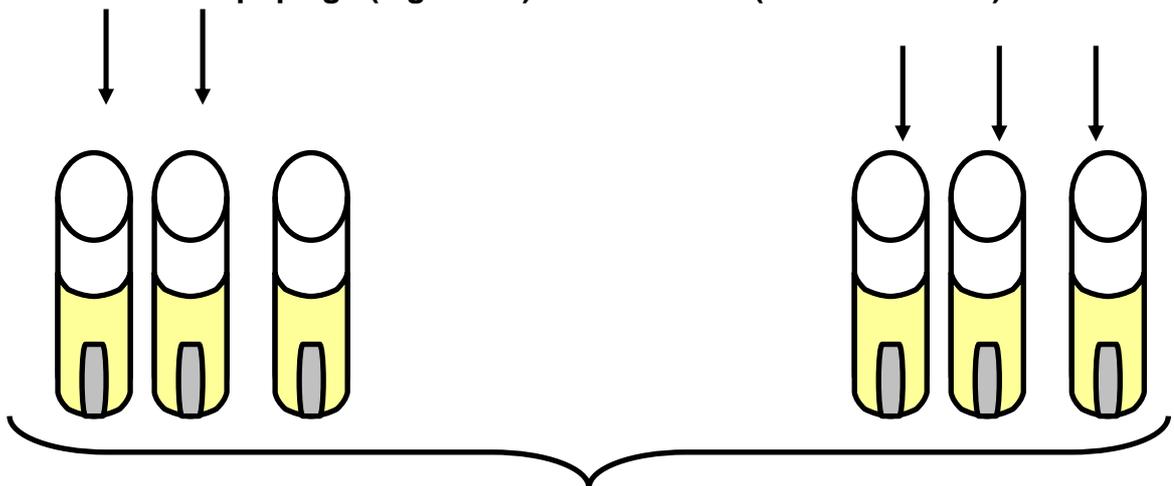
LOGIGRAMME**Première étape : Analyse Bactériologique**

Les colonies suspectes seront repiquées sur Bouillon Thioglycolate (Paraffiner) Incuber à 37°C, pendant 20 ± 2 heures, **en anaérobiose**

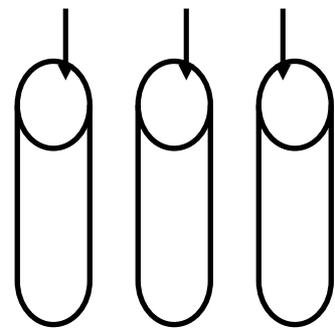
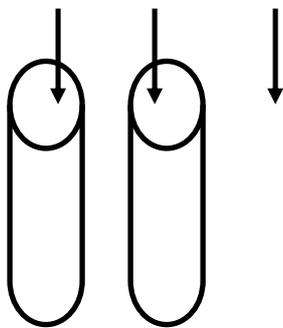


Paraffiner

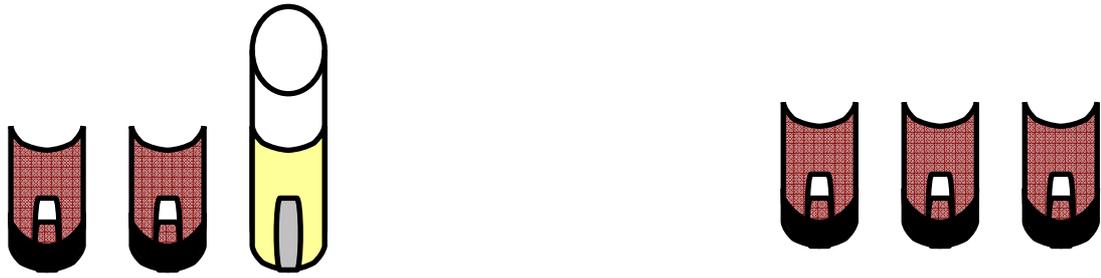
↓
Incuber à 37°C pendant 20 ± 2 heures **en anaérobiose**
Puis repiquage (5 gouttes) sur milieu LS (Lactose Sulfite)



Incuber à 46°C, pendant 24 ± 2 heures,



Lecture / confirmation / Gaz + Précipité noir
Calculer a pour chaque boîte et calculer N



I. Résultats de l'analyse bactériologique.

Prévalence globale des souches de *Clostridium perfringens* dans les différentes catégories de poudres de laits analysées

Les résultats de l'analyse bactériologique de l'ensemble des prélèvements de poudres de laits analysés suivant la méthode horizontale NF V 08-056 pour la recherche et le dénombrement des *Clostridium perfringens* montrent que sur les 200 échantillons, les colonies sulfito-réductrices présumées être des *Clostridium perfringens* ont été mises en évidence dans 07 d'entre eux, soit un pourcentage de 3,50 %. Ces résultats figurent dans le tableau VI ci-après.

Tableau VI: Résultats de l'analyse bactériologique dans les différentes poudres de lait analysées.

Nature des produits	Cas positifs		Cas négatifs		Total des prélèvements
	Nbre	%	Nbre	%	
Poudre de lait d'importation à usage industriel	07	7,00	93	93	100
Poudre de lait d'importation à usage direct après reconstitution	00	0,00	100	100	100
Total	07	3,50	193	96,50	200

Les résultats rapportés par le tableau VI montrent :

- 07 cas positifs de poudre de lait d'importation à usage industriel sur les 100 échantillons analysés soit à un taux de 7,00 %.
- 93 cas négatifs de poudre de lait d'importation à usage industriel sur les 100 échantillons analysés soit à un taux de 93,00 %.
- 00 cas positifs de poudre de lait d'importation à usage direct après reconstitution, sur les 100 échantillons analysés soit à un taux 0,00%.

- 07 cas positifs parmi les 200 échantillons de poudre de laits analysés, soit un taux de 3,50 % des échantillons analysés.
- 193 cas négatifs parmi les 200 échantillons de poudre de laits analysés, soit un taux de 96,50 % des échantillons analysés.

La répartition schématique de ces résultats est représentée dans l'histogramme suivant.

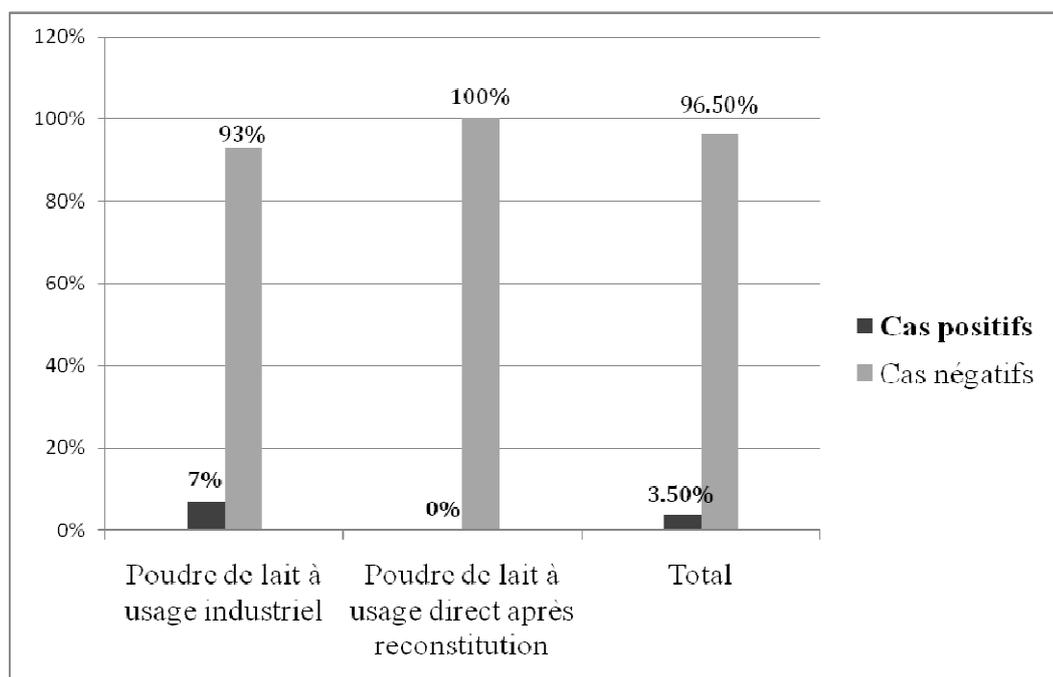


Figure 05 : Prévalence globale des colonies sulfito-réductrices présumées être *Clostridium perfringens* dans les différentes poudres de lait analysées.

II. Résultats de l'identification biochimique et du dénombrement de *Clostridium perfringens*.

La norme **NF V 08-056** préconise l'identification biochimique et le dénombrement d'au moins 3 colonies présumées être des *Clostridium perfringens*.

- **Les résultats de l'identification biochimique** des 07 cas positifs à l'analyse bactériologique dans les poudres de lait d'importation à usage industriel sont rapportés dans le tableau VII ci-après.

Tableau VII: Résultats de l'identification biochimique des 07 cas positifs de *Clostridium perfringens* dans les deux catégories de lait.

Nature des produits		<i>Clostridium perfringens</i> :				Total
		Identification biochimique = Valeur <u>b</u>				
		Confirmation		Non confirmation		
		Nbre	%	Nbre	%	
Poudre de lait d'importation à usage industriel	cas positifs	05	71,43	02	28,57	07
	Nombre globale des échantillons	05	5,00	95	95,00	100

L'identification biochimique soit le calcul de la valeur **b**, a révélé :

- ❖ d'une part, la présence 5 souches de *Clostridium perfringens* confirmées, parmi les 07 cas positifs des 100 échantillons de poudre de lait d'importation à usage industriel analysés, soit un taux de 5,00%.
- ❖ d'autre part, la non confirmation biochimique pour deux cas d'entre eux.

Ces résultats sont représentés également dans l'histogramme suivant.

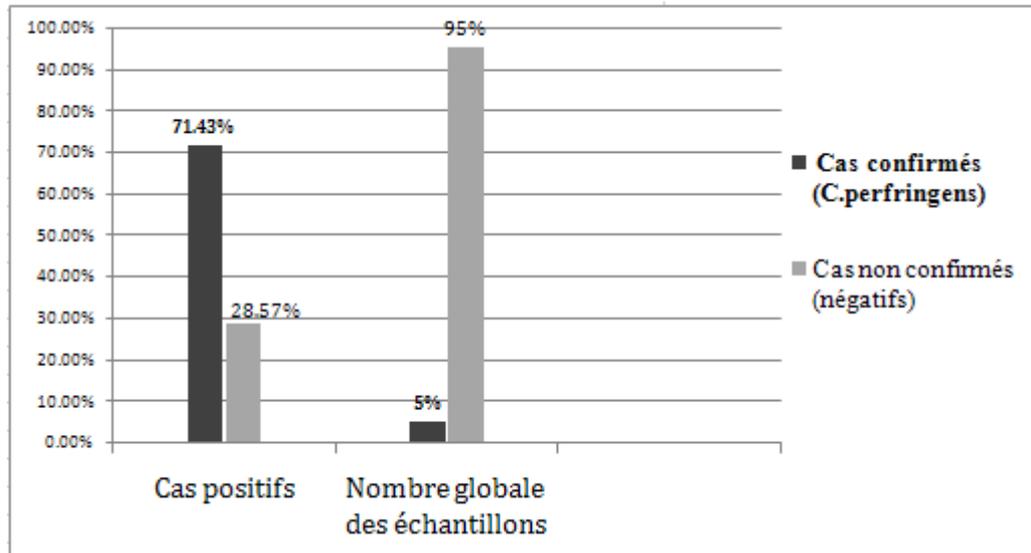


Figure 06 : Représentation graphique des résultats d'identification biochimique des souches de *Clostridium perfringens*.

- **Les résultats du dénombrement** des Cinq souches de *Clostridium perfringens* isolées et confirmées sont rapportés dans le tableau VIII ci-après.

Tableau VIII : Résultats du dénombrement des 5 souches de *Clostridium perfringens* isolées et confirmées.

Nature des produits	<i>Clostridium perfringens</i> :			
	Dénombrement des cinq souches isolées et confirmées			
	Nbre de souches confirmées	Valeur b	Valeur a	Valeur N
Poudre de lait d'importation à usage industriel	05	02	6.32	0,6.10²
		02	4.66	0,5.10²
		01	4.33	0,4.10²
		02	11.33	10²
		03	18.33	1,7.10²

Le dénombrement des 5 souches de *Clostridium perfringens* isolées et confirmées, soit le calcul des valeurs **b**, **a** et **N**, a révélé :

- ❖ la présence de 4 cas pour lesquels la valeur **N** est comprise entre 10 et 100 UFC/gr.
- ❖ la présence d'1 cas pour lequel, la valeur **N** est supérieure à 100 UFC/gr.

Notons que les deux cas non confirmés pour lesquels la valeur **b** est négative, feront désormais partie intégrante des cas négatifs, soit au total 195 cas négatifs sur 200 avec un taux de 97,50 %. Toutefois, la norme NF V 08-056 recommande fermement la prise en charge des cas négatifs par l'estimation des petits nombres en calculant aussi bien de la valeur **a** que la valeur **N** selon les équations mathématiques qui figurent dans cette propre norme. De plus, étant donné qu'il s'agit d'un produit solide, ceci se traduit par la présence de 195 cas pour lesquels la valeur **N** est inférieure ou égale à 10 UFC/gr.

En conclusion, les résultats définitifs de notre travail se résument ainsi :

- **195 cas pour lesquels la valeur **N** est inférieure ou égale à 10 UFC/gr.**
- **04 cas pour lesquels la valeur **N** est comprise entre 10 et 100 UFC/gr.**
- **01 cas pour lequel la valeur **N** est supérieure à 100 UFC/gr.**

Ces résultats sont représentés également dans l'histogramme suivant :

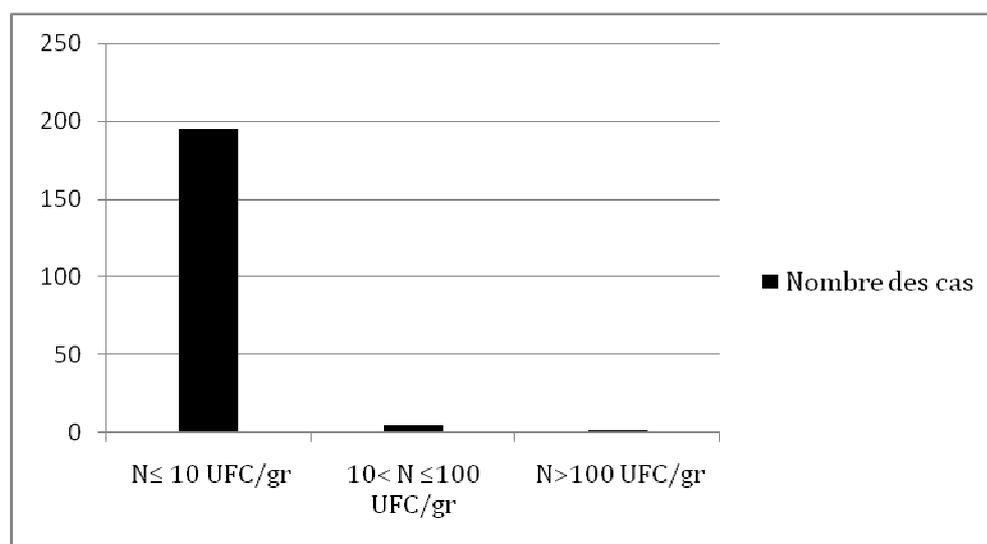


Figure 07 : Représentation graphique des résultats finaux de recherche et de dénombrement.

Les photos suivantes ont été prises au niveau du laboratoire lors des différentes étapes des analyses.

1. Analyse bactériologique.



Photo 09: Dilutions décimales



Photo 10: Jarre d'anaérobiose avant incubation



Photo 11: Aspect d'une colonie caractéristique sur milieu TSC

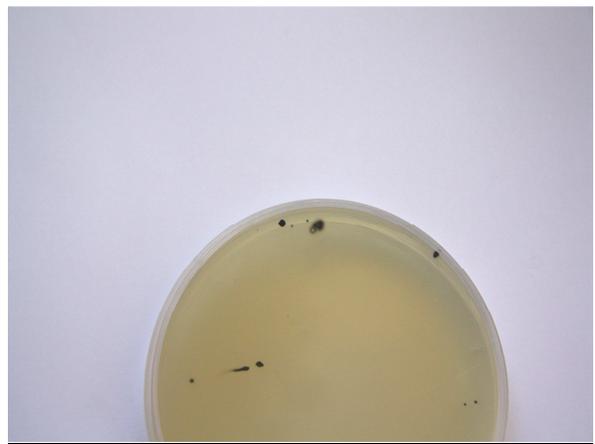
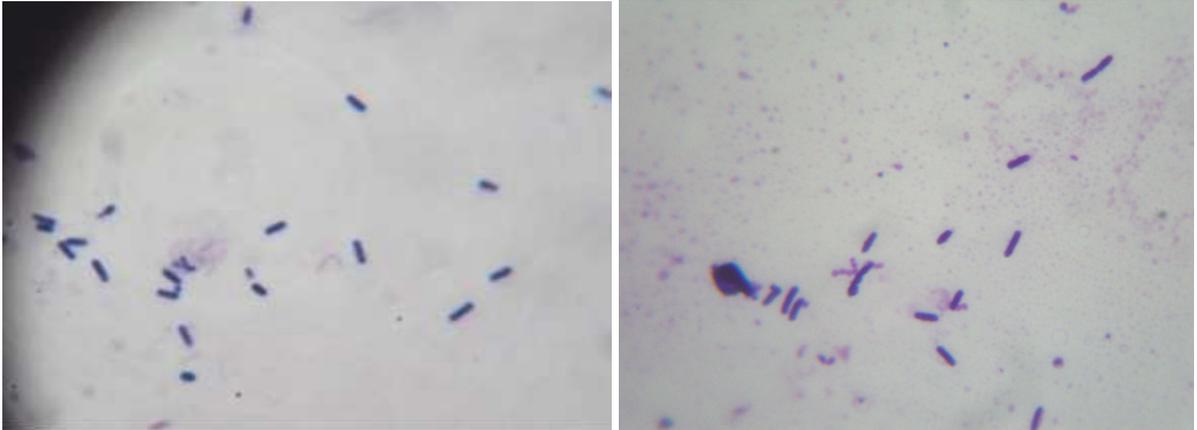
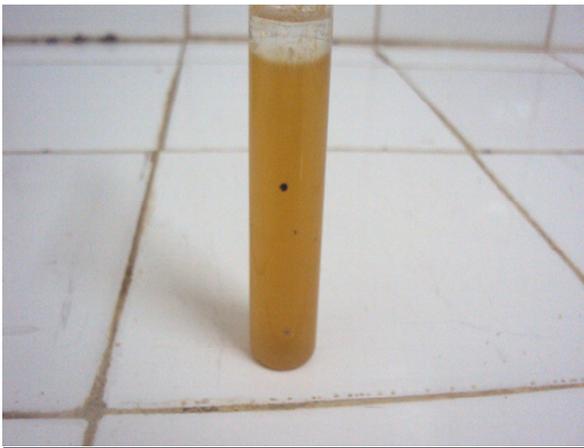


Photo 12: Aspect des colonies caractéristiques sur milieu TSC

2. Coloration de Gram.**Photo 13:** Coloration de Gram : Bacilles Gram positifs (*Clostridium perfringens*)**3. Identification biochimique.****Photo 14:** Colonie caractéristique transférée sur milieu Thioglycolate**Photo 15:** Tubes de milieu Thioglycolate après incubation**Photo 16:** Tubes de milieu LS ensemencé avant incubation**Photo 17:** Résultats positifs sur milieu LS (précipité noir +gaz)

III. Discussion.

1. Méthode d'analyse bactériologique.

De nos jours, dans le domaine de la microbiologie alimentaire plusieurs méthodes d'analyse bactériologiques sont proposées par différentes firmes internationales. Certaines sont considérées comme méthodes de routine d'autres de référence. Certaines sont validées par un organisme international d'autres sont validées uniquement dans leur pays d'origine. La sensibilité, la fiabilité, la spécificité ainsi que la rapidité des méthodes sont discutables selon les utilisateurs. Par contre, le coût est variable et dépend du pays utilisateur. En parallèle, certaines méthodes dites « tests rapides » sont également proposées par des firmes internationales mais la plus part d'entre elles ne sont pas validées.

Au cours de notre travail, nous avons choisi la méthode dictée par la norme NF V 08-056. Cette dernière est une méthode de référence, validée par l'AFNOR et par l'IANOR, homologuée et révisée. Elle présente en plus, toutes les spécificités et les qualités d'une méthode indiscutable. Cette méthode offre deux grands aspects à savoir la recherche d'une part et le dénombrement d'autre part. Or, actuellement en microbiologie alimentaire les méthodes de dénombrement sont de plus en plus privilégiées pour l'ensemble des pathogènes au détriment des anciennes méthodes basées uniquement sur la recherche ayant donc un aspect strictement qualitatif. (Lebres, 2004).

Dans le choix de cette méthode à titre expérimental, nous avons pris en considération l'aspect faisabilité et reproductibilité liés tous deux aux différents équipements disponibles au niveau du laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire.

La méthode NF V 08-056 de recherche et de dénombrement de *Clostridium perfringens* par comptage des colonies est également une méthode très sélective de part les milieux de culture utilisés et les températures d'incubation y afférentes. Ces paramètres offrent les avantages suivants :

- **Milieu de culture utilisé.** En effet, dès la première étape de l'analyse bactériologique, l'utilisation du milieu TSC (Tryptose Sulfite Cyclosérine) ou du milieu TSN (Tryptose Sulfite Néomycine) entraînent un effet inhibiteur pour les bactéries à Gram négatif et même pour certaines cocci à Gram positif, grâce au rôle de la D-Cyclosérine ou de la Néomycine rendant ainsi le milieu sélectif pour les BGP (Bacilles à Gram Positif) tels que *Clostridium perfringens*.

Autrefois, cette méthode faisait intervenir le milieu VF (Viande Foie) pour lequel il fallait chauffer l'inoculum à 80°C pendant 8 à 10 minutes dans le but d'éliminer les formes végétatives des bactéries, mais ce milieu est loin d'être sélectif. De plus, il fallait extraire les colonies de la gélose en vue de les identifier et *Clostridium perfringens* n'était que rarement identifié. (Labbe, 2001).

D'autres milieux tels que le milieu mCP (medium *Clostridium Perfringens*) spécifié dans la directive européenne 98/83, le milieu SPS (sulfite Polymyxine sulfadiazine) et le milieu WB (Wilson-Blair, BOE) ont été proposés mais sans grand succès. (Araujo et al, 2004).

Selon Wohlsen (2006), le milieu TSC reste le milieu le plus recommandé pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens*. Toutefois, le milieu TSC permet la croissance des *Clostridium* Sulfito-Réducteurs autres que *Clostridium perfringens* tels que *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sporogenes* et plus rarement *Clostridium botulinum*, mais cela peut être également influencé par la complexité microbiologique en bactéries sulfito-réductrices de l'échantillon examiné. Dans ce contexte Hauschild et Hilsheimer (1974) ont déterminé que le milieu TSC est recommandé pour différencier entre *Clostridium perfringens* et les autres Clostridies.

Par ailleurs, une étude comparative menée par Byrne et al en 2008, avec d'autres milieux de recherche et de dénombrement de *Clostridium perfringens* tels que le milieu SFP (Shahidi-Ferguson *Perfringens*), ou encore le milieu OPSP (Oleandomycin Polymyxin Sulfadiazine *Perfringens*), le milieu RCA (Reinforced Clostridial Agar), et le milieu BHI (Brain Heart Infusion Agar), a permis de conclure que le milieu TSC demeure le milieu le mieux adapté et le plus approprié.

- **L'utilisation de la Jarre d'anaérobiose.** En effet, l'incubation en Jarre d'anaérobiose contribue certainement à rendre les conditions encore plus sélectives et en faveur de la croissance de *Clostridium perfringens* au détriment des bactéries aérobies ou encore des bactéries aéro-anaérobies facultatives.
- **Température d'incubation.** La température d'incubation préconisée dans la norme NF V 08-056 est de l'ordre de $46 \pm 1^\circ\text{C}$. Cette température joue un rôle doublement inhibiteur pour toutes les formes végétatives d'une part et vis-à-vis des bactéries mésophiles d'autre part. Ceci contribue à renforcer la sélectivité du milieu TSC ou TSN, ce qui permet la croissance sélective de *Clostridium perfringens* au détriment de toutes autres bactéries mésophiles éventuellement présentes dans l'inoculum. (Labbe, 2001).
- **L'identification biochimique** des colonies présumées être des colonies de *Clostridium perfringens*. Cette étape fait partie intégrante de la méthode d'analyse décrite dans la norme. Elle consiste en l'extraction des colonies caractéristiques ayant poussé sur le milieu TSC ou TSN, en vue d'une identification biochimique qui se fait en deux étapes ; d'abord sur milieu au Thioglycolate régénéré puis sur milieu LS (Lactose – Sulfite) régénéré également et muni d'une Cloche de Durham. Par contre, il est nécessaire de rappeler que les véritables colonies caractéristiques de *Clostridium perfringens* sont des colonies de couleur blanche entourées d'une auréole noire. Cette dernière traduit la réduction des sulfites contenus dans le milieu de culture en sulfure de fer ammoniacal de couleur noire. (Eisgruber et al, 2000). Or, dans l'ancienne méthode à la gélose Viande Foie, cette étape d'extraction nécessitait une main expérimentée pour prendre exactement le centre de la colonie caractéristique car dans le cas échéant, très souvent le manipulateur prenait à tort un bout de l'auréole noire en vue d'une identification biochimique ce qui évidemment entraîner une confusion des résultats (Eisgruber et al, 2000).
- **L'interprétation des résultats.** Dans le cadre de la présente norme, l'interprétation des résultats est dictée aussi bien par l'identification biochimique des colonies caractéristiques soit par le calcul de la valeur ***h*** pour chaque boîte de gélose TSC utilisée en début d'analyse, que par le dénombrement proprement dit soit par le

calcul de la valeur **a** qui représente le nombre de *Clostridium perfringens* par boîte ainsi que par le calcul de la valeur **N** qui représente le nombre d'UFC de *Clostridium perfringens* contenus dans un gramme de produit analysé.

Dans les cas où il n'y a pas de croissance de colonies caractéristiques, la norme prévoit l'estimation des petits nombres par le calcul de la valeur **a** et la valeur **N**.

Les aspects qualitatifs et quantitatifs de *Clostridium perfringens* reposent donc essentiellement et dans tous les cas de figure sur de simples équations mathématiques et l'interprétation des résultats ne peut en aucun cas être exprimée de façon aléatoire. Deux formes d'expressions de résultats sont admises :

- présence d'au moins 10 UFC de *Clostridium perfringens* par gramme de produit.
- présence de X UFC de *Clostridium perfringens* par gramme de produit.

Toute autre forme d'expression des résultats serait en inadéquation avec la présente norme.

2. Résultats de l'analyse bactériologique.

Les résultats de la première étape de l'analyse bactériologique des deux cent échantillons de poudres de laits donnent un pourcentage de contamination par des colonies sulfito-réductrices présumées être des *Clostridium perfringens* de 3,50 %. Nos résultats sont donc comparables avec quelques résultats rapportés aussi bien au niveau national qu'international. En effet, une étude menée Aguni et Boughelmani en 2005, révèle un taux de contamination de l'ordre de 13.38% sur 142 échantillons de poudres de laits. Une autre étude menée par Zenad et Hamdi en 2010 révèle un taux de contamination de 6,00 % sur 100 échantillons de poudres de laits infantiles.

Selon Mead (1992), les cellules végétatives des Clostridies oxygène-sensibles souvent détruites par les traitements thermiques, et par conséquent le lait en poudre contient seulement les spores.

Selon Larpent (1996) et ICMSF (1998), *Bacillus* et *Clostridium* sont comptés parmi les bacilles sporogènes les plus importants dans les produits laitiers, par conséquent ils peuvent être retrouvés dans les poudres de lait suite à leur résistance aux traitements technologiques.

3. Résultats de l'identification biochimique et du dénombrement.

Les résultats de l'identification biochimique ont permis de révéler que sur les deux cent échantillons de poudres de laits analysées, *Clostridium perfringens* a été identifié avec certitude dans 5 échantillons soit à un taux de 2,5 %. Nos résultats sont encore une fois en accord avec les résultats rapportés dans la littérature nationale et internationale. En effet, sur le plan national, Mekati et Remili ont rapporté un taux de contamination de l'ordre de 6,25% sur 80 échantillons de poudres du lait industriel en 2006. Sur le plan international, bien que les poudres de lait ne soient que rarement utilisées en industrie laitière, une étude menée en Angleterre en 1981, rapporte que *Clostridium perfringens* est impliqué dans 77 cas d'intoxications alimentaires via la consommation du lait en poudre (Anonyme, 1981). De Buyser en 2001 rapporte que parmi les 6,90 % de cas de Toxi-infections alimentaires causées par *Clostridium perfringens*, le lait et les produits laitiers représentent 1.10 % des cas.

Dans les pays industrialisés, la production laitière couvre les besoins des consommateurs et l'excès de production est destiné à l'exportation sous formes de poudres du lait. Le lait est donc commercialisé le plus souvent sous forme de lait pasteurisé ou lait UHT et rarement sous forme de poudre sauf pour les laits infantiles. De plus, dans ces pays, depuis 1993, l'application du système HACCP est devenue une obligation pour toute industrie agro-alimentaire y compris les laiteries. Cette démarche a pour buts principaux, l'analyse des dangers physiques, chimiques et biologiques ainsi que la maîtrise des points critiques. De ce fait, *Clostridium perfringens* n'a aucune chance de survie dans ce type d'industries sauf cas accidentels.

4. Interprétation des résultats sur le plan technologique.

Du point de vue technologique, la transformation des laits crus en poudres de laits passent par le procédé Spray ou par l'atomisation sur cylindres chauffants. Au cours de ces procédés, il y a application d'un barème de stérilisation thermique impliquant le couple «Temps - Température» à savoir l'application d'une certaine température pendant un certain temps tout en respectant la valeur nutritionnelle du produit final ainsi que ses caractères organoleptiques. Ce barème de stérilisation fait nécessairement intervenir les notions de « Stérilité biologique ou absolue » comparativement aux notions de « Stérilité commerciale ou admise ». La Stérilité biologique ou absolue se traduit dans la plus part des cas par la présence de produits finaux brûlés ayant perdus aussi bien leur valeur nutritionnelle que leurs caractères organoleptiques. Par contre, la Stérilité commerciale ou admise se traduit par le maintien aussi bien de la valeur nutritionnelle des produits finaux que de leurs caractères organoleptiques mais pour lesquels, on est tenu de tolérer un certain seuil de bactéries révivifiables autrement dit on est tenu d'admettre la présence de quelques rares spores dans quelques rares échantillons. Ceci se traduit par une courbe exponentielle qui tend vers zéro sans jamais l'atteindre (Cf. figure 04 en page 43). C'est le cas des poudres de lait importées, mais ceci est en parfaite adéquation aussi bien avec la méthode d'analyse qu'avec la réglementation internationale.

Par ailleurs, sachant que *Clostridium perfringens* a un temps de génération très court de l'ordre de 20 minutes, (Sigrid et Granum, 2002), il est très intéressant de connaître la charge initiale des laits crus pour fixer les paramètres du barème de stérilisation (Varnam et Sutherland, 1994).

De plus, une fois déshydratés, les poudres de lait sont considérées comme des produits stables à condition que leurs emballages restent intégraux et intacts et qu'elles soient conservées dans de bonnes conditions à l'abri de l'humidité. La réduction de l'activité de l'eau par les processus de séchage à des degrés d'humidité très bas, bloque toute multiplication bactérienne. Plus tard, une fois la poudre reconstituée l'activité d'eau augmente et la croissance bactérienne redevient possible, c'est pour cela

qu'il est souhaitable de conserver le lait reconstitué à des températures qui n'excèdent pas les 6°C. (Institute of Environmental Science & Research Limited, 1995).

5. Interprétation des résultats finaux.

Nos résultats montrent la présence effective de *Clostridium perfringens* dans 5 échantillons de poudre de lait sur 200 soit à un taux de 2,5 %. De plus la différence enregistrée entre la poudre de lait à usage industriel et la poudre de lait de consommation directe après reconstitution pourrait s'expliquer de différentes façons :

- D'abord, compte tenu du caractère omniprésent de *Clostridium perfringens*, les laits crus pourraient être contaminés au cours des processus de la traite, de la collecte ou de diverses manipulations. (Tamime, 2009).
- La charge microbienne initiale des laits crus destinés au procédé de dessiccation pourrait être élevée et contenir éventuellement des germes pathogènes et sporogènes tels que *Clostridium perfringens* particulièrement dans les cas où ils proviennent de foyers d'animaux mammiteux. (Kamelia et al, 2010).
- Le traitement thermique est une étape cruciale pour assurer la sécurité sanitaire des poudres de lait; il est par conséquent considéré comme un point critique pour la maîtrise. Le traitement thermique entrepris en tant que processus microbicide devrait, au minimum, être suffisant pour obtenir la pasteurisation, qui consiste en la réduction des pathogènes à une concentration ne posant aucun danger significatif pour la santé.
- L'entreposage intermédiaire des liquides peut survenir à différentes étapes de la transformation :
 - Matière première liquide, par exemple le lait cru;
 - Produits intermédiaires avant l'étape de traitement thermique;La croissance microbienne incontrôlée à ces étapes peut influencer l'efficacité du traitement thermique.
 - Produits intermédiaires après l'étape de traitement thermique et avant l'étape de séchage.

La croissance microbienne, à cette étape, peut produire des aliments non conformes, car le séchage n'est pas considéré comme une étape d'élimination contrôlée.

- Bien que rarement, les spores de *Clostridium perfringens* peuvent dans certains cas résidées dans les tours de séchage jouant ainsi un rôle de colonisateurs de tours et contaminant par la même occasion tous les laits qui y passent. L'équipement de transformation devrait être conçu, construit et entretenu de manière à éviter toute fissure, crevasse, ligne de soudure rugueuse, structures et tubes creux, attaches, surfaces métal contre métal ou métal contre plastique, interfaces entre sols et équipements, isolations mal installés et mal entretenues, joints usés ou autres endroits inaccessibles durant le nettoyage.
- Le matériel de conditionnement, y compris les emballages, devrait être protégé contre toute contamination durant le transport, l'entreposage et l'utilisation. Le conditionnement devrait être inspecté immédiatement avant l'utilisation pour confirmer qu'il n'est pas contaminé ou endommagé.

Par ailleurs, chaque pays ou chaque communauté doit établir ses propres critères microbiologiques en se basant sur les principes et les orientations scientifiques cités ci-dessus et veiller à leur application à tous les stades de la chaîne alimentaire, du stade de matière première au stade de la consommation.

Selon nos résultats:

Les 195 cas pour lesquels la valeur **N** est inférieure ou égale à 10 UFC/gr sont en parfaite harmonie aussi bien avec la réglementation internationale, qu'avec les principes des procédés technologiques. Ils ne présentent pas de danger potentiel et sont donc acceptables.

Les 4 cas pour lesquels la valeur **N** est comprise entre 10 et 100 UFC/gr présentent un danger potentiel et auraient dû être refoulé avant même d'être dédouanés.

Le cas pour lequel la valeur **N** est supérieure à 100 UFC/gr, présente un risque réel aussi bien pour la santé des consommateurs que pour l'industrie laitière par crainte de contaminations diverses et répétées et de colonisations d'atelier. (Lebres, 2004).

En Algérie, la réglementation nationale en vigueur, soit l'arrêté interministériel n° 35 du 27 mai 1998, fixant les spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires, particulièrement les laits déshydratés conditionnés dans son annexe 3, stipule l'absence totale de *Clostridium sulfito-réducteurs* et de *Clostridium perfringens* dans 1 gramme de poudre de lait. Son application, condamnerait irrémédiablement l'ensemble des 200 échantillons analysés. Or, l'absence de *Clostridium sulfito-réducteurs* et de *Clostridium perfringens* dans un gramme de poudre de lait semble illusoire aussi bien sur le plan méthodologique que sur le plan technologique. Mais, parallèlement à notre travail, ces laits ont bien subi des contrôles officiels au préalable et ont bien été acceptés aussi bien en milieu industriel qu'en milieu commercial.

Par ailleurs, la réglementation internationale tolère au moins 10 UFC de *Clostridium perfringens* dans 1 gramme de poudre de lait aussi bien pour les poudres de lait à usage industriel que pour les poudres de laits à usage direct après reconstitution. Il en ressort d'une part, que les laboratoires nationaux officiels de contrôle devraient subir un recyclage parfait et rapide pour se mettre à niveau et que d'autre part, notre réglementation nationale mérite une révision urgente et appropriée.

CONCLUSION.

Très riche en éléments nutritifs, le lait peut être très rapidement exposé aux agressions externes telles que les micro-organismes susceptibles de se développer juste après la traite. Certains d'entre eux font partie de la flore normale du lait et sont utiles (ferments lactiques), d'autres sont nuisibles à la qualité, et d'autres encore sont pathogènes. Pour mettre fin au développement de ces micro-organismes, des traitements de conservation et de stabilisation des laits en vue de leur commercialisation sur de longues distances ont été proposés depuis de nombreuses années. Ainsi, *Clostridium perfringens*, bactérie ubiquiste, pathogène, sporogène et thermorésistante est susceptible d'être présente aussi bien dans les laits crus que dans les poudre de lait. Un contrôle microbiologique s'impose alors à différentes étapes pour éliminer ce danger biologique. Ceci est d'autant plus fondé particulièrement dans les industries qui aspirent à une démarche « Assurance Qualité » ou qui fonctionnent déjà sous HACCP.

Notre travail, basé essentiellement sur la mise en place d'une méthode de référence, fiable et validée, au laboratoire de microbiologie alimentaire de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire et sur l'évaluation du degré de contamination des poudres de lait d'importation, n'a pas l'intention de régler définitivement tous les problèmes liés à l'aspect sanitaire et sécuritaire des poudres de lait d'importation. Néanmoins, il a pu révéler la présence de 5 souches de *Clostridium perfringens* effectives sur 100 échantillons de poudre de lait d'importation à usage industriel soit à un taux de 5.00 %. Ce taux loin d'être négligeable peut être à l'origine d'accidents technologiques ou de Toxi-infections alimentaires collectives.

Les résultats obtenus sont en parfaite adéquation aussi bien avec la réglementation internationale qu'avec les procédés technologiques de conservation et de stabilisation des denrées alimentaires et particulièrement avec le procédé Spray.

Notre travail, a permis également de conclure que tous les échantillons de poudre de lait à usage direct après reconstitution étaient exempts de *Clostridium perfringens*, ce qui suppose que les traitements réservés à ces derniers sont beaucoup plus sévères.

Au terme de notre étude, nous souhaitons que notre travail soit poursuivi par la recherche et le dénombrement d'autres germes pathogènes sur diverses denrées alimentaires, pour arriver un jour à l'analyse des risques elle-même basée sur l'évaluation des risques sanitaires et sécuritaires, la gestion des risques et la communication sur les risques concernant aussi bien les aliments de production locale que ceux de l'importation. Nous souhaitons également que la réglementation nationale puisse le plus rapidement possible s'adapter aux exigences internationales.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- ACHALME (1891) cité par : MANTECA C., KAECKENBEEK C (2000). Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. *Ann. Med. Vet.* 144 : 405-408.
- AFSSA (2006). *Clostridium perfringens*: Agent de toxi-infection alimentaire, Rédaction : Mme POUMEYROL M (2003), modifiée par POPOFF M, mai 2006. Coordination scientifique : LAILLER M-R.
- AGUINI D., BOUGHELMANI L (2005). Recherche et dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs à 46°C dans la poudre de lait d'importation selon la norme XP V 08-061. Thèse d'obtention d'un diplôme d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyse. *USDB.*, p.23.
- ANONYME (1981). Morbidity and Mortality weekly Report, *US Department of Health and Human Services*, Vol 30: 115, 121, 171.
- ANONYME (1988). Guide pratique de la stérilisation des conserves traditionnelles et fermières, réseau produits fermiers de l'enseignement agricole (DGER) édition : Educargi.
- ANONYME (2005). Université Claude Bernard Lyon 1. Site de l'université Claude Bernard à Lyon 1. Mise à jour en. [<http://www.univ-lyon.1.fr>] (Consulté le 15 mai 2010).
- ANONYME (2009). Spécification technique de l'achat public laits et produits laitiers, groupe d'étude des marchés de restauration collective et de nutrition (GEM RCN). Document téléchargeable sur le site : http://www.minefe.gouv.fr/directions_services/daj/guide/gpem/table.html
- ANONYME 01. <http://www.microbes-edu.org/etudiant/imgana/clostrperf.jpg>.
- ARAUJO M., SUEIRO R-A., GOMEZ M-J., GARRIDO M-J (2004). Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *Journal of Microbiological Methods.* 57 :175-180.
- Arrêté interministériel du 13 Chaâbane 1419 correspondant au 2 décembre 1998 relatif aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leur présentation. JO n°35. JORADP.
- Arrêté interministériel de l'Aouel Safar 1419 correspondant au 27 Mai 1998 spécifiant les critères microbiologiques relatifs à certaines denrées alimentaires. JO n°35. JORADP.

- AUTEF P (2007). L'entérotoxémie en élevage ovin. *Bull GTV*. 42 :31-38.
- BAILLEUL M-N (1982). Etude diagnostique et pathogénique des entérotoxémies chez les bovins. Thèse de doctorat vétérinaire, Faculté de Médecine de Créteil. p.105.
- BERCHE P., GOILLAND J-L., SIMONEL M (1988). Bactériologie, édition Flammarion., p.386-398.
- BERGEY'S MANUAL SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (GEORGE M. GARRITY., JULIA A. BELL., TIMOTHY G. LILBURN. (2004). Taxonomic outline of the Prokaryotes. Second edition. *Springer*.p.140.
- BLAND S., SEDALLIAN A., DUBREIL L (2000). *Clostridium* autres que *Clostridium difficile*. In : FERNEY JEAN. RENAUD FRANÇOIS. LECLERCQ ROLAND. RIEGEL PHILIPPE (2007). Précis de bactériologie clinique. Edition ESKA., p.1569-1576.
- BOURGEOIS C-M., MUSCLE J-F., ZUCCA J (1996). Microbiologie alimentaire Tome1, Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition Lavoisier., p.138.
- BYRNE B., SCANNELL A-G. M., LYNG J., BOLTON D-J (2008). An evaluation of *Clostridium perfringens* media. *Food Control*. 19 : 1091–1095.
- CAMILLE DELARRAS (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire, édition Lavoisier., p. 227.
- CARLYLE JONES THOMAS., DUNCAN HUNT RONALD., KING W. NORVAL. (1997). Veterinary Pathology, sixtin edition, Williams&Wilkins.
- CAROLE L. VIGNOLA (2002). Sciences et technologie du lait, Transformation du lait. Ecole polytech de Montréal., p.292-309.
- CHEFTEL J-C., CHEFTEL H., BESANCON P (1977). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments, volume 2 Technique et Documentation, Entreprise Moderne d'édition, Paris., p.420.
- CODEX ALIMENTARIUS (1997). Principes régissant l'établissement et l'application de critères microbiologiques pour les aliments. CAC/GL 21.
- CODEX ALIMENTARIUS (1999). Norme codex pour les laits en poudre et la crème en poudre. CODEX STAN 207.
- CROSSLEY E-L (1966). Milk hygiene; hygiene in milk production, processing and distribution, Lait sec. World Health Organization, M. Abdussalam, Food and Agriculture Organization of the United Nations.

- DAUBE G (1992). *Clostridium perfringens* et pathologies digestives. *Ann. Med. Vet.* 136 :5-30.
- DUNCAN C-L., KINGS G-J., FRIEBEN W-R (1973). A paracrystalline inclusion formed during sporulation of enterotoxin producing strains of *Clostridium perfringens* type A. *J.Bacteriol.*144:845-859.
- DUNCAN C-L., STRONG D-H., SEBALD M (1972). Sporulation and enterotoxin production by mutants of *Clostridium perfringens*. *J.Bacteriol.* 110 :378-391.
- EISGRUBER H., GEPPERT P., SPERNER B., STOLLE A (2003). Evaluation of different methods for the detection of *Clostridium perfringens* phosphatases. *International Journal of Food Microbiology.* 82:81– 86.
- EISGRUBER H., SCHALCH B., SPERNER B., STOLLE A (2000). Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food, *International Journal of Food Microbiology* 57:135–140.
- ELMER H. MARTH., JAMES L., STEELE (2001). *Applied Dairy Microbiology*, 2nd édition. *Marcel Dekker, Inc.*, p.73.
- EMILIE BRIOT (2009). Maladies de l'appareil digestif des caprins. *Thèse Méd Vét*, Faculté de médecine de CRETEIL., p.28-36.
- EMILIE PEYRE (2009). principales causes et approche diagnostique des morts subites chez les ruminants. *Thèse Méd. Vét*, Alfort., p.102.
- FERNEY JEAN., RENAUD FRANÇOIS., LECLERCQ ROLAND., RIEGEL PHILIPPE (2007). *Précis de bactériologie clinique*. Edition ESKA., p.359.
- FRANKEL (1893). Cité par : MANTECA C., KAECKENBEEK C (2000). Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. *Ann. Med. Vet.* 144 : 405-408.
- GIBERT M., JOLIVET-RENAUD C., POPOFF M (1997). Beta 2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene.* 20:65-73.
- GLOCK R-D., DEGROOT B-D. (1998), Sudden death of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.*, 76:315-319.
- GOURSAUD J. Composition et propriétés physico-chimiques. In : LUQUET F-M (1985). *Laits et produits laitiers*, 1^{ère} édition. Paris : Technique et documentation Lavoisier, Vol 1, Chap 1. p.1-90.
- GRANUM PER-EINAR (1990). *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. *International Journal of Food Microbiology.* 10 :101-112.

- GREENHAM L-W., HARBER C., LEWIS E., SCULLION F-T. *Clostridium perfringens* in pelleted feed (1987). *Vet. Rec.*, 12:557
- GRECO G., MADIO A., BUONAVOGLIA D., TOTARO M., CORRENTE M., MARTELLA V., BUONAVOGLIA C (2005). *Clostridium perfringens* toxin-types in lambs and kids affected with gastroenteretic pathologies in Italy. *Vet Journal*. 170 :346-350.
- HANS P. RIEMANN., DEAN O. CLIVER (2006). Foodbornes infections and intoxications. Elsevier., p.139.
- HAUSCHILD A-H. W., HILSHEIMER R (1974). Evaluation and modification of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl Microbiol*. 27 :78-82.
- Hui Y-H., CLARY C., FARID M-M., FASINA O-O., NOOMHORM A., WELTI-CHANES. J (2008). Food Drying Science and Technology ; Microbiology, Chemistry, Applications. *DEStech Publications, Inc.* p. 710.
- ICMSF (1996). Micro-organisms in foods, Characteristics of Microbiol Pathogens. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*. p. 112-120.
- ICMSF (1998). Microorganisms in Food 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic & Professional, London. In: A Risk Profile of Dairy Products in Australia, Draft Assessment Report (2006). *Food standards Australia New Zealand*. p.197.
- Institute of Environmental Science & Research Limited (1995). Chemical & microbiological composition of infant formula. A report for the Ministry of Health/Public Health Commission October 1995. In: A Risk Profile of Dairy Products in Australia, Draft Assessment Report (2006). *Food standards Australia New Zealand*., p.197.
- JACOBSEN M., TROLLE G (1979). The effect of water activity on growth of clostridia. *Nord Vet Med*. 31:206-213.
- JAMES M. JAY., MARTIN J-LOESSNER. DAVID A-GOLDEN (2005). Modern food microbiology. *Springer science*. p.149.
- JARRIGUE R (1980). Principes de la nutrition et l'alimentation des ruminants. Besoins alimentaires des animaux. Valeurs nutritive des aliments, Institut National de la Recherche Agronomique, 2nd édition. p.621.
- JEAN-LOUIS CUQ. Microbiologie Alimentaire Controle Microbiologique Des Aliments, Manuel technique. Site de l'université Montpellier 2. Mise à jour en. [<http://www.univ-montp2.fr>] (Consulté le 15 mai 2009).

- ..
- JEANTET ROMAIN., MICHEL ROIGNANT., GERARD BRULE (2001). Génie des procédés appliqué à l'industrie laitière. Edition Lavoisier., p.133-149.
- KADRA B., GUILLOU J-P., POPOFF M., BOURLIOUX P (1999). Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immun and Med. Microbiol.* 24:259-266.
- KAMELIA M. OSMAN., MONA I. EL-ENBAAWY., NASHWA A. EZZELDIN., HUSSEIN M.G. HUSSEIN (2010). Nitric oxide and lysozyme production as an impact to *Clostridium perfringens* mastitis. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33:505–511.
- KANAKARAJA R., HARISSA D-L., SONGER J-G., BOSWORTH B (1998). Multiplex PCR assay for detection of *Clostridium perfringens* in feces and intestinal contents of pigs and in swine feed. *Veterinary Microbiology.*, 63 :29-38.
- LABBE RONALD. G (2001). *Clostridium perfringens*. In: POUCH FRANCES DOWNES., ITO KEITH. Compendium of methods for the microbiological examination of foods fourth edition. *American Public Health Association.*, p.325-330.
- LARPENT J-P. Lait et produits laitiers non fermentés. In : BOURGEOIS C-M., MUSCLE J-F., ZUCCA J (1996). Microbiologie alimentaire Tome1, Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Edition Lavoisier., p.271-293.
- LATOUR P (2004). Les entérotoxémies chez les bovins: bilan bibliographique et contribution à l'amélioration du diagnostic nécropsique et bactériologique. Thèse Méd Vét. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon.
- LEBRES E (2004). Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments, IPA.
- LECLERC H., MOSSEL D-A-A., BERNIER J-J., FOURRIER A (1999). Microbiologie : Le tube digestif l'eau et les aliments. Doin éditeurs-paris., p.241.
- LEFEVRE P-C., BLANCOU J., LHERMITTE R (2003). Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail : Europe et régions chaudes 2. p.1064-1072.
- LEONHART L (2004). Les entérotoxémies: actualités bibliographiques. Thèse Méd Vét. Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Lyon.
- MADR, 2009. Exposé présenté par le ministre de l'Agriculture et du développement rural, le 14 octobre 2009 devant la commission des finances et du budget de

l'Assemblée populaire nationale (APN) dans le cadre du projet de loi de finances 2010. Portail du premier Ministre.

- MAHAUT MICHEL., JEANTET ROMAIN., PIERE SCHUKH., GERARD BRULE (2000). Les produits industriels laitiers. Edition Lavoisier., p.49-90.
- MANTECA C., DAUBE G., JAUNIAUX T., LINDEN A., PIRSON V., DETILLEUX J., GINTER A., COPPE P., KAECHENBEECK A., MAINIL J-G (2002). A role for the *Clostridium perfringens* β 2 toxin in bovine enterotoxaemia. *Veterinary Microbiology*. 86 :191-202.
- MANTECA C., KAECKENBEEK C (2000). Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. *Ann. Med. Vet.* 144 : 405-408.
- MARIE-LAURE DE BUYSER., BARBARA DUFOUR., MURIELLE MAIRE., VERONIQUE LAFARGE (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology*. 67 :1-17.
- McCOURT M-T., FINLAY D-A., LAIRD C., SMYTH J-A., BELL C., BALL H-J (2005). Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and a-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. *Veterinary Microbiology*. 106: 259-264.
- MEAD G-C (1992). Principles involved in the detection and enumeration of clostridia in foods. *International Journal of Food Microbiology*. 17 :135-143.
- MEERA SHARMA., USHA DATTA., PALLAB ROY., VERMAT S., SHOBHA SEHGAL (1997). Low sensitivity of counter-current immunoelectrophoresis for serodiagnosis of typhoid fever. *J. Med. Microbiol.* 46:1039-1042
- MEKATI R., REMILI W (2006). Recherche et dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les poudres de laits industriels. Thèse d'obtention d'un diplôme d'ingénieur d'état en contrôle de qualité et analyse. *USDB*, p.48.
- MEUGNIER H., REGLI A-S., FERNEY J (2000). Les méthodes de diagnostic moléculaire en bactériologie. Précis de bactériologie clinique. *ESKA*. 94 :159-192.
- MEYER A., DEIANA J., BERNARD A (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigé DOIN éditeurs., p.221-223.
- MICHEL FREDERIGHI (2005). Bactériologie alimentaire, compendium d'hygiène des aliments. 2nd édition, Economica. Paris.
- MOSELIO SCHAECHTER (2004). Consulting Editor Joshua Lederberg, the Desk Encyclopedia of Microbiology. *Elsevier Academic Press*.

- NAGAHAMA M., MICHIUE K., SAKURAI J (1996). Production and purification of *Clostridium perfringens* alpha-toxin using a protei-hyperproducing strain, *Bacillus brevis* 47. *FEMS Microbiology Letters*.145 :239-243.
- NAIK H-S., DUNCAN C-L (1977). Rapid detection and quantitation of *Clostridium perfringens* enterotoxin by counter-immuno-electrophoresis, *Appl. Microb.* 34:125-128.
- PATRICK FACH., SYLVIE PERELLE (2005). *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum*, bactériologie alimentaire « compendium d'hygiène des aliments » 2nd édition, Economica., p.77.
- PETIT L., GIBERT M., POPOFF M-R (1999). *Clostridium perfringens* toxinotype and genotype. *Trends in microbiology*. Vol 7, n°3 :104-110.
- PHILIPPEAU C., JULLIAND V., GONCAVES S (2003). La place des entérotoxémies dans les morts subites en élevages charolais. Journée Nationale *GTV-Nantes* : 225-240.
- PIATTI R. M., IKUNO A. A., BALDASSI L (2004). Detection of bovine *clostridium perfringens* by polymerase chain reaction. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* V.10:154-160.
- PILIET C J-L ., BOURDON., TOMA B., MACHAL N., BALBASTRE C., PERSON J-M (1986). Bactériologie médicale et vétérinaire, systématique bactérienne ; Doin éditeurs-paris., p.285-286.
- POPOFF M (1989). Les entérotoxémies. *Revue Med. Vet.* 140 : 479-491.
- POUMEYROL M. *Clostridium perfringens* In: BOURGEOIS C-M., MESCLE J-F., ZUCCA J (1996). Microbiologie alimentaire, 2nd édition. Paris : Technique et documentation, Lavoisier., p.139-140.
- SIGRID BRYNESTAD., GRANUM PER. EINAR (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology*. 74 :195-202.
- SLOTH P., REGNIER J., VIEILLE (1990). Evaporation et séchage du lait. In : FRANÇOIS M. LUQUET. Les produits laitiers, Transformation et technologies. 2nd édition, Lavoisier., p.17-33.
- SMITH B-P (1996). Diseases caused by *Clostridium perfringens* toxins, large animal internal medicine. Diseases of horses, cattle, sheep and goats, 2nd édition. 2040 :768-771.
- SMITH W-P., McDONEL J-L (1980). *Clostridium perfringens* type A: in vitro system for sporulation and entérotoxine synthesis. *J.Bacteriol.*144, 1 :36-311.

- SONGER J-G (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clin Microbiol.* 9 :216-234.
- TAMIME A-Y (2009). Milk Processing and Quality Management. First publication, *BlackWell Publishing Ltd., USA.*
- TONY HART., PAUL SHEARS., OLIVIER GAILLOT (1997). Atlas de poche de microbiologie, 1^{ère} édition. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.
- TROLLER J-A (1986). Water relation of food borne bacterial pathogens. An updated review. *Journal of food protection.* 49:656-670.
- UZAL FRANCISCO. A (2004). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *Anaerobe.* 10:135–143.
- UZAL FRANCISCO. A., SONGER J-G (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *J Vet Diagn Invest.* 17:528–536.
- UZAL FRANCISCO. A., SONGER J-G (2008). Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J Vet Diagn Invest.* 20: 253–265.
- VALLET A (2000). Les entérotoxémies. In : Maladie des bovins. 3^{ème} édition, France Agricole., p.50.
- VARNAM A-H., SUTHERLAND J-P (1994). Milk and Milk Products: Technology, Chemistry and Microbiology. In: A Risk Profile of Dairy Products in Australia, Draft Assessment Report (2006). *Food standards Australia New Zealand.*, p.196.
- VERON M., LE-MINOR L (1989). *Clostridium*, bactériologie médicale 2nd édition, Paris Flammarion., p.1107.
- VIJAYALAKSHMI VELUSAMY., KHALIL ARSHAK., OLGA KOROSTYNSKA., KAMILA OLIWA., CATHERINE ADLE. Y (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors, *Biotechnology Advances.* 28: 232–254.
- WALKER R-L., HIRCH D-C., MACLACHLAN N-J (2004). *Clostridium*, Veterinary microbiology. 2nd édition., p.535.
- WELCH ., NUTTAL (1892). Cité par: MANTECA C., KAECKENBEEK C (2000). Des postulats de Koch à l'entérotoxémie bovine : petites histoires et vieux papiers. *Ann. Med. Vet.* 144 : 405-408.
- WOHLSEN T., BAYLISS J., GRAY B., BATES J., KATOULI M (2006). Evaluation of an alternative method for the enumeration and confirmation of *Clostridium perfringens* from treated and untreated sewages. *Letters in Applied microbiology.* 42 :438-444.

- WRIGLEY D-M., HANWELLA H-D S-H, THON B-L (1995). Acid exposure enhances sporulation of certain strains of *Clostridium perfringens*. *Anaerobe*. 1 :263-267.
- ZENAD W (2010). Qualité microbiologique, physico-chimique et toxicologique des laits infantiles dans la wilaya d'Alger. *Thèse Magistère Vétérinaires. ENSV. Alger. p.70.*

LES ANNEXES

ANNEXE I

Formule des milieux de culture et réactifs:

Solution de Tryptone-Sel-Eau (diluant):

Tryptone	1g
Eau distillée	1000 ml
Chlorure de sodium	8,5g

Gélose Tryptose Sulfite à la Cyclosérine (TSC), exempte de jaune d'œuf:

- **Milieu de base:**

Peptone de caséine	15.0g
Peptone de soja	5.0g
Extrait auto lytique de levure	5.0g
Bisulfite disodique (Na ₂ S ₂ O ₅) anhydre	1.0g
Citrate de fer (III) ammoniacal	1.0g
Agar-agar bactériologique	9 à 18g
Eau	1000 ml

Préparation:

- Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en portant à l'ébullition.
- Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,6 à 25°C.
- Répartir en tubes ou en flacons selon utilisation et stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

- **Solution D-Cyclosérine:**

D-Cyclosérine (poudre blanche cristalline)	4.0g
Eau distillée	100 ml

Préparation:

- Dissoudre la D-Cyclosérine dans l'eau distillée et stériliser la solution par filtration.
- Conserver au réfrigérateur à 4±2 °C pendant quatre semaines au maximum.

- **Milieu complet:**

Avant l'ensemencement, ajouter 1ml de la solution stérilisée de D-Cyclosérine pour 100ml de base de TSC stérile liquéfié à 47°C.

Milieu Thioglycolate liquide:

Peptone de caséine	15.0g
L-Cystine	0,5g
D-Glucose	5.0g
Extrait auto lytique de levure	5.0g
Chlorure de sodium	2,5g
Thioglycolate de sodium (mercaptoacétate)	0,5g
Agar-agar bactériologique	0,5 à 0,2g
Resazurine	0,001g
Eau	1000ml

Préparation:

- Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en portant à ébullition.
- Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 25°C.
- Répartir le milieu en tubes par quantités de 10ml et stériliser à 121°C pendant 15 minutes.
- Au moment de l'emploi, ce milieu doit être régénéré.

Milieu Lactose Sulfite (LS):

- **Milieu de base:**

Peptone de caséine	5.0g
Extrait auto lytique de levure	2,5g
Chlorure de sodium	2,5g
Lactose	10g
L-Chlorhydrate de cystine	0,3g
Eau	1000ml

Préparation:

- Dissoudre les composants déshydratés dans l'eau, en chauffant si nécessaire.
- Ajuster le pH si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 25°C.
- Répartir le milieu en tubes par quantités de 8ml, ajouter une cloche de Durham puis stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

- **Solution de Métabisulfite de sodium:**

Métabisulfite de sodium	1,2g
Eau	100ml

Préparation:

- Ajouter le métabisulfite de sodium dans l'eau, mélanger, puis stériliser par filtration.
- Préparer cette solution extemporanément

- **Solution de citrate de fer (III) ammoniacal:**

Citrate de fer (III) ammoniacal	1,2g
Eau	100 ml

Préparation:

- Ajouter le citrate de fer (III) ammoniacal dans l'eau, mélanger, puis stériliser par filtration.
- Préparer cette solution extemporanément.

- **Milieu complet :**

Au moment de l'emploi, désaérer les tubes de base (LS), puis ajouter dans chaque tube:

- 0,5 ml de la solution de métabisulfite de sodium.
- 0,5 ml la solution de citrate de fer (III) ammoniacal.

ANNEXE II

Tableau I : Présentation des échantillons des poudres du lait industriel.

Numéro de prélèvement	N° de lot	pays d'origine	date de fabrication	Date de péremption	taux de MG
1	92337	Belgique	14-11-2009	14-11-2011	0%
2	3905	Irlande du Nord	01-11-2009	01-05-2011	26%
3	95570	France	09-12-2009	09-06-2010	0%
4	105587	France	26-12-2010	26-06-2010	0%
5	105592	France	04-01-2010	04-07-2010	0%
6	9318	Irlande du Nord	14-11-2009	14-05-2011	0%
7	105597	France	15-01-2010	15/15/2011	0%
8	92369	Belgique	18-12-2009	18-12-2011	0%
9	9335	Irlande du Nord	15-12-2009	15-12-2010	26%
10	9336	Irlande du Nord	03-01-2010	03-01-2011	26%
11	92358	Belgique	07-12-2009	07-12-2011	0%
12	105589	France	02-01-2010	02-07-2011	0%
13	9334	Irlande du Nord	30-11-2009	30-11-2010	26%
14	95580	France	20-12-2009	20-06-2010	0%
15	92280	Belgique	06-01-2010	06-01-2012	0%
16	105594	France	05-01-2010	05-07-2011	0%
17	95588	France	29-12-2009	29-06-2011	0%
18	45563	Hollande	04-01-2010	04-07-2011	0%
19	45565	Hollande	26-01-2010	26-07-2011	0%
20	45660	Hollande	18-02-2010	18-08-2011	0%

Tableau II : Présentation des échantillons de poudres de lait de consommation directe après reconstitution.

Numéro de prélèvement	N° de lot	pays d'origine	date de fabrication	Date de péremption
01	916234555	Nouvelle Zélande (Malaisie)	11-06-2009	09-12-2010
02	91423455VA	Nouvelle Zélande (Malaisie)	22-05-2009	19-11-2010
03	91633455VA	Nouvelle Zélande (Malaisie)	12-06-2009	10-12-2010
04	1578/IT19 AS 16882	Suisse (Algérie)	17-02-2009	18-04-2011
05	1578/IT18 AS 16882	Suisse (Algérie)	07-02-2010	17-04-2011
06	1578/CT05 AS 16882	Suisse (Algérie)	19-01-2010	04-10-2011
07	1578/CT07 AS 16882	Suisse (Algérie)	25-01-2010	06-10-2011
08	1578/BT15 AS 16882	Suisse (Algérie)	27-01-2010	14-09-2011
09	91693455VA	Nouvelle Zélande (Malaisie)	18-06-2009	16-12-2010
10	AL2HP 557	Nouvelle Zélande (Indonésie)	16-10-2009	15-10-2011
11	2580101	Argentine	28-10-2008	28-10-2010
12	91333455VA	Nouvelle Zélande (Malaisie)	13-05-2009	10-11-2010
13	0704236415	Algérie(Blida)	09-03-2010	17-02-2011
14	H337-3891210 1307	Argentine	03-12-2009	03-12-2011
15	H242-380906 0633	Argentine	30-08-2009	30-08-2011
16	09C0002271	France	23-11-2009	23-11-2011
17	1283190510 M1871	Danemark	11-2008	11-2010
18	92213455RB	Nouvelle Zélande (Malaisie)	09-08-2009	06-02-2011
19	0704771604	Algérie(Blida)	21-04-2009	21-04-2011
20	08C0003854	France	16-05-2009	16-05-2011