

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de Fin d'Etudes

En vue de l'obtention du

Diplôme de Docteur Vétérinaire

Contribution à la recherche des Staphylococcus aureus dans le lait pasteurisé commercialisé dans la région de Dar El Beïda et Bab Ezzouar.

Présenté par

Mlle. MEGHAZ Khaoula

Soutenu le : Samedi 25 Juin 2016

Devant le jury composé de:

Présidente :	Dr. BENMOHAND C	Maître Assistante classe A	ENSV d'Alger
Promoteur :	Dr.MATALLAH A.M	Maître-assistante classe A	ENSV d'Alger
Examineur 1 :	Dr ZENAD W	Maître-assistante classe A	ENSV d'Alger
Examineur 2 :	Dr. FERHAT L.	Maître-assistante classe A	ENSV d'Alger

Année universitaire :

2015-2016

Remerciements

Avant tout nous remercions Allah le tout puissant qui nous a donné le courage, la volonté et la patience pour réaliser ce travail. Qu'il nous soit permis de remercier tous ceux qui d'une manière ou d'une autre, de près ou de loin, y ont contribué.

Nos sincères remerciements vont en particulier à :

Dr BENMOHAND.C. Maître assistant classe A, pour nous avoir fait l'honneur de présider notre jury.

Dr FERHAT.L. Maître assistant classe A Et **Dr ZENAD.W.** Maître assistant classe A pour avoir accepté d'examiner notre travail.

Dr MATALBAH A.M. Maître assistant classe A De nous avoir encadrés. Ainsi pour ses orientations et son aide précieuse.

L'ingénieur de laboratoire de L'ENSV « **Louiza** » pour son aide précieuse et ses orientations. sans lesquelles nous n'aurons jamais pu avancer.

Dr Idrès.T. Maître assistant classe A, pour votre aide précieuse, vos orientations.

Nous remercions également tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin à la réalisation de notre mémoire.

À vous tous, un grand Merci.

DEDICACE

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance... Aussi, c'est tout simplement que



Je dédie ce Mémoire...

À MES TRÈS CHERS PARENTS

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

À mes sœurs : **Hana**, **Amina**, **Nour El Houda**, **Lina Nour El Imen** (la prunelle de mes yeux, la personne la plus chère à mon cœur ma petite sœur adorée <3).

À mes frères : **Abd Errahmane** et **Ahmed Amin**.

À mon beau frère **Alissa**, mon neveu **Youssef** le chouhou de la famille ainsi qu'à mes nièces adorées : **Wissal** et **Sérine**.

À mes chers enfants, je vous dédie ce mémoire avant même que vous existiez^^.

À ma meilleure amie du monde **Karima**, aucune dédicace ne te serait suffisante. Sans toi, la vie serait bien triste et si fade. Tu sais comme personne me remonter le moral quand je ne vais pas bien. Et tu sais surtout m'accompagner dans toutes les étapes de ma vie. Je peux compter sur toi pour m'écouter des heures et m'apporter les petits conseils si précieux dont tu as le secret. Tu me permets d'avancer. Merci d'être présente dans ma vie...

À ma Best-Friend **Hanan**, même si nous sommes loin l'une de l'autre désormais, cela n'a aucune importance. Nous sommes toujours BF's.

À mes intimes de l'ECOLE NATIONALE SUPPERIEURE VETERINAIRE :
Toutes les dédicaces du monde ne sauront vous remercier d'être toujours à mes côtés, de m'aider à surmonter les moments les plus difficiles de ma vie. Merci pour votre affection, pour les bons moments, pour les fous rires, je vous aime beaucoup, merci pour tout.

À **Dr Idrès Takfarinas**, comment saurais-je vous remercier pour tous ce que vous avez fait pour moi, tous les remerciements du monde ne sauront vous remerciertrès cher Monsieur, je me permets de vous dédier ce travail, Vous êtes le grand frère que la vie m'a offert. Votre gentillesse et votre soutien m'ont fait comprendre que la bonté existe encore dans ce monde. Votre amour pour le travail et vos conseils font de vous une personne qui nous a marqués durant le cursus. J'espère que vous soyez toujours là pour nous aider à évoluer et aller toujours de l'avant! Merci infiniment pour tout.

À toutes mes amies De **L'ENSV** sans exception.

À toutes mes amies De **la résidence universitaire El Alia**.

À toute **ma famille**.

À toutes les personnes qui m'ont aimé et qui m'ont soutenu.

À mes collègues de promotion (2011-2016).

À la mémoire de mon grand-père **Saïd** et ma grande mère **Aïcha**, que dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.

Khaoula

Résumé

Denrée alimentaire d'une richesse non négligeable et d'un apport protéique certain, le lait peut, par le biais de certains incidents technologiques, se trouver être contaminé par différents pathogènes, tous de nature à nuire à la santé du consommateur. Le présent travail a pour objectif de rechercher les *Staphylococcus aureus* dans le lait pasteurisé de deux marques différentes commercialisées dans la région d'Alger (Dar El Baida et Bab Ezzouar).

Les résultats obtenus rapportent l'absence de *S. aureus* dans les 30 échantillons testés suggérant ainsi le respect d'une bonne pasteurisation.

La présence de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques dans 20% des échantillons serait due à d'autres espèces de *Staphylococcus* à coagulase négative.

Mots clés : lait pasteurisé, *Staphylococcus aureus*.

Abstract

Food from a significant richness and some protein intake, milk can, through some technological problems, be contaminated with various pathogens, all likely to harm the health of the consumer. The aim of the present work was to research *Staphylococcus aureus* in two marks of pasteurized milk marketed in the Algiers region (Dar El Baida and Bab Ezzouar).

The results relate the absence of *S. aureus* in 30 samples tested from two dairies suggesting a good pasteurization.

The presence of characteristic or non-characteristic colonies in 20% of samples can be explained by the presence of other species of *Staphylococcus* with a negative coagulase.

Keywords: pasteurized milk, *Staphylococcus aureus*.

ملخص

غذاء بقدر كبير من الغنى، ومصدر أكيد للبروتينات. الحليب يمكنه وبسبب بعض الحوادث التكنولوجية، ان يتلوث بمختلف الجراثيم، والتي تضر صحة الانسان.

وهذا العمل كان هدفه تقييم الجودة البكتيرية للحليب المبستر الذي يتم تسويقه في الجزائر العاصمة (الدار البيضاء، وباب الزوار)، والبحث تحديدا عن المكورات العنقودية الذهبية، مستندين على معايير بحث ميكروبيولوجية

والنتيجة المتحصل عليها تفيد بعدم وجود المكورات العنقودية الذهبية، في 30 عينة المختبرة، والقادمة من منتجي حليب مقترحين، وكذا بسترة جيدة للحليب المسوق من طرف هاذة المصانع.

تواجد عشرون بلمئة من المستعمرات المعبرة و الغير معبرة في العينات المدروسة يمكن تفسيره بوجود عينات اخرى من المكورات العنقودية الذهبية، من فئة كوغولاز سلبية.

كلمات مفتاحية: حليب مبستر، المكورات العنقودية الذهبية، معايير

Liste des abréviations

S.aureus	Staphylococcus aureus
TIAC	Toxi-infection alimentaire collective
C	Celcius
NaCl	Chlorure de sodium
a_w	activité de l'eau
ARNr	Acide ribonucléique
SCP	Staphylocoques à <i>coagulase positive</i>
SCN	Staphylocoques à <i>coagulase négative</i>
TSA	gélose trypticase-soja
BP	Baird-Parker
H₂O₂	Eau oxygénée
Ufc	d'unité formant colonies
NPP	dénombrement le plus probable
ADN	Acide Desoxyribonucléique
BP-RPF	Baird-Parker :Rabbit Plasma Fibrinogen
PCR	Polymerase chain reaction
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Sandwich Assay.
DO	Déclaration obligatoire
g	Gramme
ml	Milliliter
UHT	Ultra haute temperature
Sec	Seconde
CMT	test de mammites de Californie
BLD	Basse de longue durée
HCD	Haute de courte durée
HIDAOA	Hygiène industriel denrées alimentaire d'origine animale.
BHIB	Bouillon cœur-cervele
Abs	Absence
NF	Norme Française
GN	Gélose nutritive
EDTA	acide éthylène diamine tétra acétique
RPLA	Reverse Phase Latex Agglutination
ELFA	Enzyme Linked Fluoresceine Assay.
ELA	Enzyme Immunosorbent Assay Simple solutions to false-positive staphylococcal
TECRA	enterotoxin assays with seafood tested with an enzyme-linked immunosorbent assay kit
TSE	Tryptone-Sel-Eau.

Liste des figures & des tableaux

Liste des Figures

Figure I	Coloration de Gram de <i>S. aureus</i>	09
Figure II	Schéma décrivant les différentes phases de formation du biofilm bactérien de la colonisation à la dissémination.	16
Figure III	Pourcentage des échantillons présentant des colonies.	30
Figure IV	Résultats des tests de catalase et de coagulase de la laiterie A.	31
Figure V	Pourcentage des échantillons présentant des colonies.	32
Figure VI	Résultats des tests de catalase et de coagulase de la laiterie B.	32

Liste des tableaux

Tableau I	Caractéristiques des différents kits	14
Tableau II	Conditions environnementales permettant la croissance de <i>S. aureus</i>	15
Tableau III	Tableau récapitulatif des résultats obtenus de la laiterie A.	29
Tableau IV	Tableau récapitulatif des résultats obtenus de la laiterie B.	31

Liste des photos

Photo 01	Bécher 225ml (Photo personnelle).	19
Photo 02	Pipette (Photo personnelle).	20
Photo 03	Micropipette de 1 ml (Photo personnelle).	20
Photo 04	Micropipette de 0.1 ml (Photo personnelle).	20
Photo 05	Embouts de précision de 0.1 ml et 1 ml (Photo personnelle). (Photo personnelle).	21
Photo 06	Gélose Beard Parker (Photo personnelle).	21
Photo 07	Incubateur (Photo personnelle)	21
Photo 08	Vortex (Photo personnelle).	22
Photo 09	Tubes de dilutions (Photo personnelle).	22
Photo10	Echantillons du lait (Photo personnelle).	22
Photo11	Plasma de lapin (Photo personnelle).	23
Photo12	Eau oxygénée (Photo personnelle).	23
Photo13	Bouillon cœur-cerveau (Photo personnelle).	23
Photo14	Solution mère utilisée (Photo personnelle)	24
Photo 15	Préparation de la 1 ^{ère} décimale (Photo personnelle).	25
Photo 16	Préparation de la 2 ^{ème} décimale (Photo personnelle).	25
Photo 17	Agitation des dilutions (Photo personnelle).	25
Photo 18	Prélèvement de chaque dilution (Photo personnelle).	25
Photo 19	Etape d'ensemencement (Photo personnelle).	25
Photo 20	Préparation de la pipette Pasteur (Photo personnelle).	26
Photo 21	Etape d'étalement sur gélose (Photo personnelle).	26
Photo 22	Incubation des échantillons (Photo personnelle).	26
Photo 23 & 24	Dénombrement des colonies obtenues (Photo personnelle).	26
Photo25	Colonies caractéristiques de <i>S. aureus</i> (Photo personnelle).	27
Photo26	Colonies non caractéristiques (Photo personnelle).	27
Photo27	Prélèvement de plasma de lapin. (Photo personnelle).	28
Photo28	Ajout des colonies obtenues (Photo personnelle).	28
Photo29	Incubation du mélange (Photo personnelle).	28
Photo30	Dépôt du H ₂ O ₂ sur lame de microscope (Photo	28

Liste des photos

personnelle).

Photo31 Absence de bulles d'air (Photo personnelle). **28**

Photo32 Présence de bulle d'air (Photo personnelle). **28**

Table des matières

Introduction générale	01
<u>PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE</u>	02-18
Chapitre I : Technologie du lait	02-08
1-Définitions	02
1.1-Le lait	02
1.2-Le lait pasteurisé	02
1.3-Le lait stérilisé	02
1.4-Le lait stérilisé UHT	02
1.5-Le lait en poudre	03
2-Le lait de vache	03
2.1-Définition	03
2.2-Composition	03
2.3- La traite	04
3. Les mammites	05
3.1Définition générale des mammites	05
3.2 Mammites cliniques	05
3.2.1 Les mammites cliniques suraiguës	05
3.2.2 Les mammites cliniques aiguës	05
3.2.3 Les mammites cliniques subaiguës et chroniques	06
3.3 Mammites subcliniques (invisible)	06
4. Procédés de fabrication de lait pasteurisé	06
4.1 Description du procédé	06
Chapitre II: Staphylocoques aureus	08-17
1.Introduction	08
2. Taxonomie	08
3. Habitat	09
4. Physiologie	10
4.1. Caractère culturaux	10
4.2. Méthodes de détection de <i>Staphylococcus aureus</i>	10
4.2.1. Méthodes phénotypiques	10
4.2.1.2. Méthodes quantitatives et qualitatives	11
4.2.2. Méthodes moléculaires	11
4.2.2.a. Caractérisation moléculaire des souches de <i>S. aureus</i>	11
4.2.3. Méthodes normalisées et alternatives	12
4.2.3.1. Dénombrement de <i>S. aureus</i> par les méthodes normalisées	12
4.2.3.2. Méthodes alternatives	12
4.3. Méthodes de mise en évidence des entérotoxines staphylococciques	13
4.3.1. Méthodes biologiques	13
4.3.2. Méthodes de détection génomique type PCR (Polymerase Chain Reaction)	13
4.3.3. Méthodes de détections antigéniques types ELISA (Enzyme Linked	13

Table des matières

Immunosorbent Sandwich Assay)	
4.4. Facteurs influençant la croissance de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
4.4.1. Facteurs nutritionnels	14
4.4.2. Facteurs physicochimiques	15
4.5. Physiologie de la croissance en biofilm	15
5. Problèmes sanitaire liés à la présence de S. aureus	16
5.1. Toxinogénèse de S. <i>aureus</i> dans les aliments : les toxi-infections alimentaires à Staphylocoques	16
5.2. Clinique	17
<u>PARTIE EXPERIMENTALE</u>	19-38
Objectifs	19
1. Matériels et méthodes utilisés	19
1.2 Matériels utilisés	19
1.3 Méthodes de laboratoire employées	24
2. Résultats	29
3. Discussion des résultats	35
4. Conclusion	37
5. Recommandation	38
Annexes	39-45
Références bibliographiques	46-48

La production laitière est l'un des points névralgique soigneusement suivi par les pouvoirs publiques, elle peine à combler la demande nationale en dépit des efforts déployés, à en juger par la facture d'importation de la poudre de lait qui ne cesse de croître engouffrant ainsi des sommes considérables de devise.

Denrée essentiel de la culture culinaire nationale, le lait est un produit subventionné par l'état, ce dernier veille à stabiliser son prix à portée des bourses des familles algérienne, et ce, en agissant à différents niveaux, à savoir, le producteur, le collecteur, le transformateur et enfin les grandes unités de production, ces dernières connaissent en ce moment leur âge d'or, en témoignent le nombre considérable d'unités mise en service cette dernière décennie.

En effet, il n'est pas certains que la totalité des unités de production répondent aux normes reconnues, recommandées et dictées par le codex alimentarius, cela est indubitablement pas sans conséquences sur la santé du consommateur. En effet, au cours du process de production, le lait peut être sujet à différents incidents de production ou de contamination diverses et variées. Il en résulte alors l'altération de la qualité de ce dernier et bien souvent sa contamination le rendant ainsi impropre à la consommation voir même dangereux.

Staphylococcus aureus représente l'un des germes les plus recherchés dans le lait, sa présence peut être la cause de toxi-infections parfois même mortelles.

Les objectifs de ce présent travail sont :

- ✓ Donner une idée sur l'éventuelle présence d'un germe pathogène « *Staphylococcus aureus* » dans le lait pasteurisé ;
- ✓ D'apporter des améliorations concernant les moyens de transports et l'entreposage du lait dans les points de ventes ;
- ✓ D'apporter des conseils au consommateur afin d'éviter au maximum les risques de toxi-infections alimentaires par le lait.

*Recherches
bibliographiques*

1-Définitions

1.1-Le lait

Le lait est un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur de la matière grasse en β carotène. 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 du colostrum »(GOURSAUD,1985)(Tamime,2009).

1.2-Le lait pasteurisé

La dénomination « lait pasteurisé » est réservée au lait :

- a) Traité par 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 les 6°C ;
- c) Présentant une réaction négative au test phosphatase (VIGNOLA, 2002).

1.3-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)

1.4-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).

1.5-Le lait en poudre :

Selon l’arrêté interministériel du 02 décembre 1998 (JORADP) relatifs aux spécifications techniques des laits en poudre et aux conditions et modalités de leurs présentations : 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).

2-Le lait de vache :

2.1-Définition :

Légalement : L’ordonnance fédérale réglant le commerce des denrées alimentaires , dont le but est de protéger les consommateurs , définit le lait comme suit : on entend par lait le lait de vache sans aucune modification de sa composition et tel qu’il est obtenu par une traite régulière, ininterrompu et complète de bêtes saines et bien nourries .le lait d’autre animaux doit être désigné comme tel(par ex. lait de chèvre, mélange de lait de chèvre et de vache) (LAUSANNE,1969).

2.2-Composition :

Les composants principaux du lait sont l’eau et la matière sèche à raison de :

- Eau : environ 87.3%=7/8
- Matière sèche : environ 12% c’est la partie nutritive du lait .Sa composition moyenne est la suivante :

Composants	Teneur en % dans le lait
Lactose ou sucre de lait	4.8
Matière grasse	3.8
Protéine	3.4
✓ Caséine	2.7
✓ Albumine	0.7
✓ Globuline	Traces
Sels minéraux	0.7
Total matière sèche	12.7
Matière grasse	3.8
Solde, extrait sec dégraissé	8.9

La teneur centésimale en matière sèche supposée sans la graisse étant moins variable que la matière sèche totale, on calcule souvent la teneur du lait en extrait sec dégraissé.

Toutes ces substances sont considérées comme les composants principaux du lait. Ce dernier contient en outre plus de 90 petits composants, les plus importants sont les vitamines, des traces de certains éléments, des enzymes ou ferments solubles et des lipides.

Les composants principaux et les petits composants peuvent être considérés comme la partie chimique du lait qu'il faut distinguer de la partie vivante .qui comprend en particulier les bactéries, qui ont un rôle important dans la digestion et la fabrication des produits laitiers. (LAUSANE,1969)

2.3- La traite

Il est nécessaire de mettre en place une routine de traite pour réduire le risque de mammites. En respectant les points suivants :

✓ 10 règles d'or

1. *Propreté des mains du trayeur*
2. *Établir et maintenir un rythme de traite dans un environnement non stressant*
3. *Établir un ordre de traite*
4. *Préparation du pis et des trayons*
 - Élimination des premiers jets :
 - diagnostic des mammites
 - élimination des germes
 - effet ocytocique
 - Lavage à sec des trayons : élimination des germes d'environ.
5. *Attache des gobelets trayeurs : < 30 sec après la préparation*
6. *Temps de traite : en moyenne 5 minutes*
7. *Couper le vide avant d'enlever la griffe*
8. *Éviter la surtraite (overmilking) : traite prolongée volontaire ou involontaire.*
9. *Éviter l'égouttage :*

Lait d'égouttage (stripping milk) = c'est le lait des acinis récupéré par une pression sur la griffe (machine stripping) ou massage manuel (manual stripping) ou non simultané du quartier (égouttage)

10. *Hygiène du trayon après la traite. (HANZEN,2009).*

3 Les mammites

3.1 Définition générale des mammites

La mammite est une inflammation de la mamelle dont l'origine la plus fréquente est la pénétration d'une bactérie dans un cartier par le canal du trayon. On peut différencier la mammite clinique (qui entraîne une modification systématique de l'aspect du lait, avec présence ou non de signes locaux sur la mamelle et de signes généraux), de la mammite subclinique que l'on met en évidence grâce au comptage cellulaire somatique individuels (CCSI) ou à ceux du quartier (LAUSANE, 1969).

Il est souhaitable de classifier les mammites selon leur gravité, vu qu'elles ne se ressemblent pas.

3.2 Mammites cliniques

Les mammites cliniques sont caractérisées par des modifications macroscopiquement visibles de la quantité et de la qualité du lait, de la sécrétion de la mamelle (critère le plus précoce et le plus constant), de symptômes locaux inflammatoires de la mamelle (douleur, chaleur, tuméfaction) et de symptômes généraux (hyperthermie, anorexie, arumination) selon la gravité et la simultanéité des symptômes, on distingue, par ordre décroissant de gravité, les mammites cliniques suraiguës, aiguës, et subaiguës (POUTREL, 1985)

3.2.1 Les mammites cliniques suraiguës

Dues le plus souvent aux staphylococcus *aureus* ou parfois à des bactéries anaérobies telles le genre Clostridium. La sécrétion lactée est soit interrompue, soit très modifiée et présente alors un aspect séreux, aqueux ou hémorragique, ce type de mammite se caractérise par une très grande rapidité d'apparition (d'une traite à l'autre par exemple).elle est rare mais souvent mortelle (HANZEN et CASTAIGNE, 2002).

Les mammites gangréneuses dues aux Staphylococcus *aureus* sont les plus souvent mortelles.

3.2.2 Les mammites cliniques aiguës

Elles surviennent à tous les stades de la lactation et sont déclenchées par différents types de bactéries. La production laitière est modifiée en qualité et en quantité, le lait présente un aspect crémeux, de couleur bleu verdâtre et d'odeur nauséabonde. Cette mammite « mammite d'été » est due le plus souvent à l'action conjuguée de plusieurs bactéries (HANZEN et CASTAIGNE, 2002).

3.2.3 Les mammites cliniques subaiguës et chroniques

Le lait présente d'une façon plus ou moins régulière des grumeaux dans les premiers jets, petit à petit, la sécrétion diminue, le quartier s'indure et finit par se tarir complètement. L'évolution chronique est la forme la plus caractéristique des infections dues à des Staphylocoques ou à des streptocoques (HANZEN et CASTAIGNE,2002)

3.3 Mammites subcliniques (invisible)

Une vache avec une mammite subclinique n'exprime aucune manifestation clinique malgré la réaction de son organisme à l'infection, le lait et le quartier semblent normaux, alors pour la détecter on utilise souvent le CCS et le CMT « test de mammites de Californie »

La mammite subclinique peut rester à ce stade là plusieurs mois ou guérir spontanément, elle peut aussi s'aggraver, et dans ce cas on a l'apparition des signes cliniques, d'où on peut appeler cette infection « un cas clinique ».

La mammite subclinique est 2 à 3 fois plus fréquente que la mammite clinique selon le type de l'agent pathogène présent dans le troupeau. (LEVESQUE,2006).

4. Procédés de fabrication de lait pasteurisé

4.1 Description du procédé

La pasteurisation peut se faire par :

- a. **Pasteurisation basse de longue durée « BLD»:** au cours de laquelle le produit est chauffé et retenu dans une citerne close
- b. **Pasteurisation haute de courte durée «HCD»:** au cours de laquelle le produit est chauffé dans un échangeur thermique puis retenu dans un chambreur tubulaire pour la durée requise.

La méthode de pasteurisation la plus répandue actuellement utilise des échangeurs thermiques conçus pour la pasteurisation HCD (haute température/courte durée).

Ce procédé implique que le lait soit chauffé à une température précise puis gardé en mouvement constant à cette même température pendant assez longtemps afin d'éliminer ou inhiber les micro-organismes.

Parmi les conséquences de cette méthode, le retard du début de la dégradation microbienne prolongeant ainsi la durée de vie du lait.

Pour l'obtention des mêmes effets que le procédé HCD, la pasteurisation par lot implique que le lait du conteneur soit chauffé à une température donnée pour une période assez longue, la chaleur communiquée aux échangeurs thermiques ou au pasteurisateur peut provenir de l'extérieur ou de l'intérieur.

La discontinuation des conditions de circulation conditionne davantage de temps pour la bonne efficacité du procédé (CODEX ALIMENTARIUS ,2011).

1. Introduction

S. aureus représente l'espèce la plus largement incriminée dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ; elle appartient au groupe des Staphylocoques à coagulase positive. Deux sous espèces ont été décrites au sein de l'espèce *S. aureus* : *S. aureus aureus* et *S. aureus anaerobius*. Cette sous espèce a été isolée d'abcès chez le mouton et possède des caractéristiques particulières (croissance en anaérobiose, catalase négative). Cette sous espèce est très marginale, la quasi-totalité des souches de *S. aureus* appartiennent à la sous espèce *aureus* (ROSENBACH, 1884).

Les principales caractéristiques de *S. aureus* sont résumées ci-après: *S. aureus* est une bactérie aéroanaérobie facultative, thermosensible, qui requiert des températures de croissance comprises entre 6 et 46°C (avec optimum à 37°C). C'est une bactérie neutrophile (croissance entre pH 4 et 9,8) qui survit dans les aliments déshydratés et/ou congelés et qui tolère pour sa croissance une concentration en sels (NaCl) élevée (jusqu'à 20%) et une activité de l'eau a_w réduite (0,83). *S. aureus* étant une bactérie exigeante en acides aminés et en vitamines, sa croissance peut être inhibée par la présence de flores de compétition présentes dans les aliments. Son rôle pathogène en toxi infection alimentaire collective (TIAC) est lié à la sécrétion de protéines dotées de propriétés neurotoxiques chez l'Homme et qu'on appelle entérotoxines staphylococciques (DE LA FUENTE et al., 1985).

2. Taxonomie

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

En fonction de la capacité de production de la coagulase libre les espèces sont classées en deux groupes.

Les Staphylocoques à *coagulase positive* (SCP), généralement considérés comme pathogènes et les Staphylocoques à *coagulase négative* (SCN), réputés moins dangereux. (DWORKIN et al, 2006).

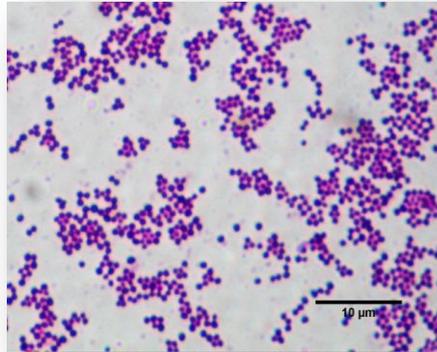


Figure I: Coloration de Gram de *S. aureus* (Anonyme 1)

3. Habitat

Staphylocoque *aureus* est un organisme ubiquitaire c'est une flore commensale de la peau et des muqueuses des animaux à sang chaud en particulier l'homme. Cette flore commensale est responsable de diverses infections chez ces hôtes et ce grâce à sa capacité d'adaptation et de résistance au stress.

S.aureus peut se retrouver également dans l'environnement en dehors de ses hôtes. Profitant de diverses voies de transmissions (contacts entre individus, air, surface, sécrétions...). Cette espèce peut infecter de nouveaux hôtes, elle est responsable de diverses infections nosocomiales, aussi elle peut contaminer des aliments et provoquer des toxi-infections alimentaires dues à la production d'entérotoxines.

Ce germe survit dans les environnements hydriques (eaux de surfaces, boue d'épandage...), mais d'une manière très faible. Les eaux de baignade collective peuvent constituer un vecteur de transmission entre individus. Néanmoins, les infections nosocomiales, les toxi-infections alimentaires et les mammites des animaux en production laitière restent les principales problématiques associées à *S.aureus*. (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

4. Physiologie

4.1. Caractère culturaux

Staphylococcus aureus est aéro-anaérobie facultatif, et cultivé facilement sur milieu usuel, sa croissance est optimale à 37°C, et le pH optimal est de 7.5. La culture est rapide en bouillon ordinaire ; il n'y a pas de production de pigment en milieu liquide. Sur milieu gélosé non sélectif qui permet un développement rapide des Staphylocoques, les colonies sont lisses, rondes, bombées et de 2 à 3 mm de diamètre après 24h à 37°C (De BUYSER ET SUTRA,2005).

4.2. Méthodes de détection de *Staphylococcus aureus*

4.2.1. Méthodes phénotypiques

4.2.1.1. Milieux sélectif ou non sélectif

Les milieux non sélectifs les plus utilisés sont les milieux solides tels que la gélose au sang, la gélose nutritive, la gélose trypticase-soja (TSA), la gélose cœur-cervelle (BHI agar), la gélose P, la gélose dénombrement au lait (Plate Count Agar+lait), et leurs équivalents en milieu liquide (BHI, bouillon TS).

Les milieux sélectifs visent à inhiber les bactéries autres que *S. aureus* et à favoriser la croissance de ce dernier, les agents sélectifs sont :

- *La concentration élevée en NaCl* : elle permet de réduire l' a_w , comme dans la gélose de Chapman ;
- *La concentration en chlorure de lithium, glycine et tellurite de potassium*, agents retenus dans le milieu de Baird-Parker (BP) et ses dérivés.

Le milieu Baird-Parker (BP) représente le milieu de choix en bactériologie alimentaire car il permet la meilleure récupération des souches de *S.aureus* stressées grâce au pyruvate de sodium, activateur de croissance (dégrade H₂O₂), et au jaune d'œuf qui exerce un effet protecteur contre le tellurite (De BUYSER ET SUTRA,2005)

4.2.1.2. Méthodes quantitatives et qualitatives

Habituellement dénombrés sur milieux sélectifs solides, Les cultures de SCP sont obtenues après ensemencement en surface des milieux de culture par étalement direct de 0.1ml de l'échantillon à tester, celui-ci est en général une suspension-mère au 1/10^{ème} de l'aliment et de ses dilutions décimales. Le tout est incubé 24 à 48h à 37°C.

Les colonies se présentent avec un aspect caractéristique après leur incubation, elles seront soumises à un test de confirmation puis dénombrées. Le résultat peut être donné en nombre d'unité formant colonies (ufc) par g ou par ml d'aliment.

Si le dénombrement ne concerne qu'un petit nombre de SCP, une étape préalable d'enrichissement en milieu sélectif solide est nécessaire. Le dénombrement le plus probable (NPP) est la méthode qui permet une estimation du nombre de *S. aureus* par g ou par ml d'échantillon testé, cette même méthode, simplifiée permet aussi d'obtenir un resultat de type (présence ou absence de SCP dans x grammes d'aliment), elle est alors dite, méthode de recherche quantitative (De BUYSER ET SUTRA,2005).

4.2.2. Méthodes moléculaires

4.2.2.a. Caractérisation moléculaire des souches de *S. aureus*

Parmi les nombreuses méthodes décrites pour typer les souches de *S. aureus*, les méthodes phénotypiques telles que le typage par phages (BLAIR et WILLIAMS, 1961) et le sérotypage capsulaires (KARAKAWA et al., 1985 ; BOUTONNIER et al., 1989) ont été délaissées car beaucoup moins discriminantes que les méthodes moléculaires.

Parmi ces dernières, certaines sont utilisées pour classer les souches au sein d'une espèce comme le ribotypage (DE BUYSER et al., 1989) ou pour typer des souches à des fins épidémiologiques par utilisation de l'électrophorèse en champs pulsés (PREVOST et al., 1992 ; SCHLICHTING et al., 1993 ; AKIDENEN et al., 2001). Cette technique a été utilisée avec succès pour typer les souches de *S. aureus* isolées de différentes matrices alimentaires (TSEN et al., 1997 ; VANDERLINDE et al., 1999 ; HENNEKINNE et al., 2003 ; RUSIKOVA et al., 2008).

La PCR utilisée, à partir des années 1990, a permis la recherche des gènes des *S. aureus* aussi bien dans l'ADN d'extrait alimentaire que dans les souches en culture pure. Les gènes ciblés codent principalement les entérotoxines, mais ces derniers ne sont pas

systématiquement présents chez *S.aureus*. Alors le choix s'est également porté sur des gènes spécifiques de cette espèce telle que le gène 'nuc' de la thermonucléase. (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

4.2.3. Méthodes normalisées et alternatives

4.2.3.1. Dénombrement de *S. aureus* par les méthodes normalisées

S. aureus est habituellement dénombré dans les aliments selon des méthodes normalisées.

La **technique de comptage classique** se fait sur un milieu sélectif gélosé après inoculation de dilution décimale et incubation à 37°C suivant la recommandation des normes NF EN ISO 6888-1, -2, -3, et la norme française AFNOR NF V08-057-1.

La différence entre les méthodes recommandées par ces normes est le milieu de culture utilisé, ainsi, les normes françaises NF EN ISO 6888-1 et -2 décrivent deux types de milieux sélectifs gélosés, le milieu BP, qui nécessite un test de confirmation (la recherche de coagulase en tube), et le BP-RPF.

La norme NF EN ISO 6888-3 est la seule méthode de recherche et dénombrement par la technique NPP après enrichissement. Le milieu décrit dans cette norme est le bouillon de Giolitti et Cantoni modifié (Formule proche du milieu BP liquide).

Quel que soit le milieu utilisé, les colonies à coagulase positive sont dénombrées et le résultat est exprimé en UFC de *S.aureus* par g ou par ml

En ce qui concerne la détection par PCR, il s'agit d'une série de normes réunies : Norme NF EN ISO 22174, 2005 (Exigences générales et définitions), la norme NF EN ISO 20837, 2006 (Protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un bouillon sélectif d'enrichissement) et la norme NF EN ISO 20838, 2006 (Amplification et détection quantitative) d'aliment (DE BUYSER et SUTRA, 2005).

4.2.3.2. Méthodes alternatives

Les méthodes alternatives commercialisées sont rapide et plus faciles à l'emploi que les méthodes normalisées pour le dénombrement de *S. aureus*. Ces méthodes doivent être testées selon un protocole reconnu de validation, pour pouvoir être utilisées à la place des méthodes normalisées, en incluant des essais comparatifs avec une méthode de référence ainsi qu'une étude collaborative. En citant par exemple : Le PetrifilmTM Staph express (3M) et le

rapid' Staph test (Bio-Rad) qui ont été validés par l'AFNOR en 2003 et en 2005, respectivement. (DE BUYSER et SUTRA, 2005).

4.3. Méthodes de mise en évidence des entérotoxines staphylococciques

Différentes techniques peuvent être utilisées :

4.3.1. Méthodes biologiques

Le principe de cette méthode est de faire absorber à un animal, souvent des primates, des échantillons suspects. Il est aisé de comprendre que ces méthodes ne sont plus d'actualité vu leurs couts très chers, leur sensibilité minime, le temps qu'elles prennent et le non confort au bien être animal. (WIENEKE,1991).

4.3.2. Méthodes de détection génomique type PCR (Polymerase Chain Reaction)

Des sondes pour la recherche des séquences nucléotidiques codant pour les entérotoxines de type A, B, C, D, E, H ont été identifiées et synthétisées. Avec ces techniques, la sensibilité et la spécificité ont été améliorées. Cependant, elles ne permettent pas de distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes. D'autre part la présence des séquences nucléotidiques ne nous renseigne pas sur la production effective de toxines. La technique PCR doit donc être confirmée par une autre méthode. (WIENEKE,1991).

4.3.3. Méthodes de détections antigéniques types ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Sandwich Assay)

En 1977, Saunders et Barlett ont utilisés pour la première fois la méthode ELISA pour la détection des entérotoxines. Les techniques immunoenzymatiques sont désormais les plus couramment employées car elles sont commodes, rapide et sensibles.

Dans la pratique, différents kits sont présents sur le marché. Ces trousse de détection utilisent des techniques d'agglutination et des techniques **ELISA** (tableau I) (BRETT,1998).

Tableau I : Caractéristiques des différents kits

(BRETT, 1998 ; WIENEKE, 1991).

Nom	Type	Toxines détectées	Durée	Sensibilité
SET RPLA	RPLA	A-B-C-D	24 h	0.2ng/ml
SET EIA	EIA	A-B-C-D-EH	1 nuit + 7h	0.1 à 1* ng/ml (*SED)
TECRA S.E.V.I	EIA	A-B-C-D	4 h	1 ng/ml
SET TRANSIA tubes en plaques	EIA	A-B-C-D-E	1 h 30 min	0.05 à 0.2 ng/ml
RIDASCREEN SET	EIA	A-B-C-D-E	2 h 30 min	0.1 ng/ml
SET VIDAS	ELFA	A-B-C-D-EH	1 h 30 min	0.1 à 1* ng/ml (*SED)

4.4. Facteurs influençant la croissance de *Staphylococcus aureus*

4.4.1. Facteurs nutritionnels

S.aureus présente une variété des niches écologiques remarquable de coloniser. C'est pour cela que cette espèce est peu exigeante sur le plan nutritionnel, donc elle a une forte capacités biosynthétiques, cependant elle dispose d'un arsenal important d'enzymes capables de fournir les éléments indispensables à sa croissance à partir d'une grande variété de substrats.

Pour se développer, *S.aureus* requiert une source organique d'azote (acides aminés), des vitamines, des cations métalliques et une source d'énergie. Plusieurs études ont été consacrées à l'identification précise de ces exigences. (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

4.4.2. Facteurs physicochimiques

Tableau II : Conditions environnementales permettant la croissance de *S. aureus* (LE LOIR et GAUTIER, 2010).

Condition	Optimum	Gamme
Activité de l'eau	> 0.99	0.83 --> 0.99
pH	6-7	4-10
Température	37	7-47.8
% NaCl	0-4	0-20
Disponibilité en oxygène	Aérobie	Aérobie-Anaérobie

4.5. Physiologie de la croissance en biofilm

Le mode de développement des bactéries dans la majorité des biotopes est appelé biofilm, ce dernier est décrit par la fixation des microorganismes aux surfaces formant ainsi des communautés structurées, hétérogènes et multi-espèces. *Staphylococcus aureus* a la capacité d'adhérer à de multiples surfaces telles que les matériels d'exploration, les implants et les muqueuses lésées. Elle peut également adhérer dans les produits de l'agroalimentaire. (Colonisation des surfaces et des produits).

Un biofilm peut être défini par une communauté microbienne attachée à une surface et fréquemment englobée dans une matrice d'exopolymères. Les cellules sessiles qui sont les cellules en biofilm renferment des caractéristiques particulières tant au niveau de la croissance que de l'expression génétique et de la production de protéines (COSTERTON et LEWONDOWSKI ; SHIRTLIFF et *al.*, 2002).

Une fois matures, les biofilms des écosystèmes naturels forment une architecture tridimensionnelle permettant ainsi aux micro-colonies d'exister sous la forme de structures qui ressemblent à la forme de champignons ou de piliers cylindriques. Afin d'avoir accès aux nutriments et à l'oxygène, un réseau de canaux s'intercale entre ces structures. (COSTERTON et *al.*, 1999 ;DONLAN,2002)

La capacité de *S. aureus* à former des biofilms fait d'elle l'une des principales étiologies des infections aiguës et chroniques qui suivent la mise en place d'implants médicaux. (STOODLEY et *al.*, 2002 ;JEFFERSON,2004).

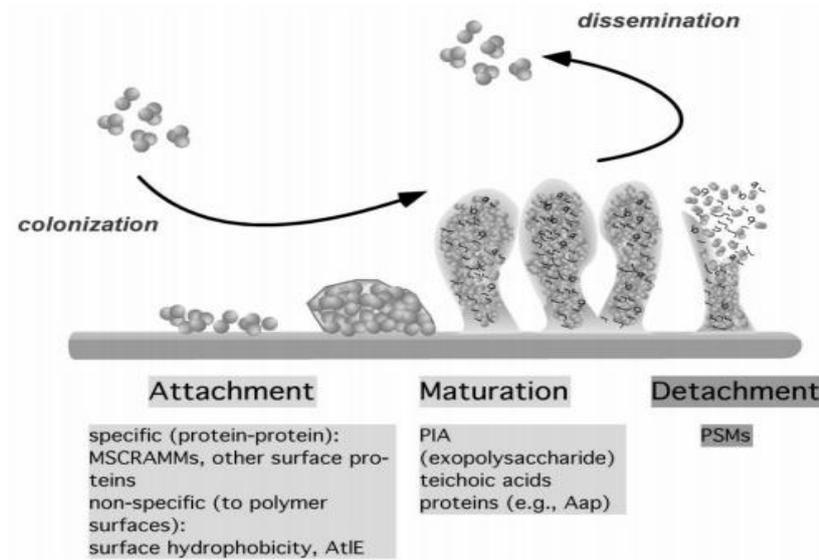


Figure II : schéma décrivant les différentes phases de formation du biofilm bactérien de la colonisation à la dissémination.(ANONYME 2)

5. Problèmes sanitaire liés à la présence de *S. aureus*

5.1. Toxinogénèse de *S. aureus* dans les aliments : les toxi-infections alimentaires à Staphylocoques

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie par l'incidence de deux cas ou plus, d'une maladie similaire, à tableau symptomatologique le plus souvent gastro-intestinal. La cause de la maladie peut être rapportée à une même origine alimentaire. (DELMAS et *al.*, 2006)

Afin de diligenter une enquête épidémiologique et d'identifier le (ou les) aliments responsable(s) et de prendre des mesures correctives (modification de préparation, réduction de la contamination des matières premières...) pour que l'incident ne se reproduise pas, les TIAC en France font partie de la liste des trente maladies à déclaration obligatoire (DO) auprès des inspecteurs des services vétérinaire et des affaires sanitaires et sociales.

Les foyers peuvent être classés en trois classes :

- Confirmés : lorsque l'agent pathogène est isolé dans un prélèvement clinique (sang/selles) ou dans des restes alimentaires ;

- Suspectés, lorsque l'agent pathogène n'a pas été mis en évidence ; il est alors suspecté à l'aide d'un algorithme d'orientation étiologique prenant en compte les signes cliniques, la durée médiane d'incubation et le type d'aliments consommés ;

-D'étiologie inconnue lorsque l'agent pathogène n'a été ni confirmé ni suspecté à l'aide de l'algorithme ;

Les TIAC à Staphylocoques résultent de l'ingestion d'entérotoxines staphylococciques. Ces dernières sont des toxines protéiques préformées dans les aliments par des souches entérotoxigène de Staphylocoques à coagulase positive. Il s'agit en réalité d'une intoxication (ou intoxication alimentaire à Staphylocoques). L'espèce incriminée est principalement *S. aureus*. La multiplication bactérienne et la toxinogénèse ont lieu quand l'aliment se trouve dans des conditions favorables pour cette multiplication.

Le diagnostic d'une TIAC à Staphylocoques est confirmé lorsqu'au moins un des paramètres cités ci-dessous est vérifié :

-Dénombrement de *S. aureus* dans l'aliment suspecté supérieur à 10^5 unités formant colonies (ufc)/g ;

-Détection des entérotoxines staphylococciques dans la matière alimentaire ;

-isolement à partir des fécès des malades et de la matrice alimentaire d'une souche de *S. aureus* de même lysotype (BRYAN et al.,1997).

5.2. Clinique

L'intoxication causée par les Staphylocoques a été décrite en 1914 par Barber. L'ingestion de lait provenant d'une vache atteinte de mammite et laissé à température ambiante pouvait provoquer une symptomatologie gastro-intestinale. Cette intoxication est due à la présence d'une substance toxique produite par les Staphylocoques dans le lait.

En 1930 il a été mis en évidence que l'ingestion d'un gâteau avait provoqué une symptomatologie de type gastro-intestinale chez onze personnes. Ces auteurs ont associés l'épisode à la présence d'une exotoxine produite par une souche de Staphylocoque doré à caractère hémolytique. Afin de confirmer leur hypothèse, ils ont produit des surnageant de culture de cette souche qu'ils ont ensuite administrés par voie intraveineuse à un lapin et par

voix orale à trois volontaires humains. Suite à l'administration de ces surnageant, le lapin a présenté une diarrhée aqueuse létale, tandis que les trois volontaires humains ont éprouvé, trois heures après ingestion, des nausées, des frissons et des vomissements.

Ces deux premières descriptions confirment que c'est une maladie à symptomatologie d'apparition rapide. La période d'incubation et la sévérité des symptômes observés dépendent de la concentration d'entérostomies ingérées et de la sensibilité de chaque individu (HARVEY et GILMOUR , 2000).

Dans les 30 minutes à huit heures (trois heures en moyenne) après ingestion de l'aliment contaminé, les premiers symptômes, nausées suivies de vomissements caractéristiques incoercibles, apparaissent. D'autres symptômes ont été fréquemment décrits lors d'épisodes d'intoxication à Staphylocoques, parmi lesquels nous citerons :

- Les douleurs abdominales, la diarrhée, les vertiges, les frissons et faiblesse générale, parfois accompagnée d'une fièvre modérée.
 - Lors des cas les plus sévères d'intoxication, des maux de tête, une prostration et une hypotension ont été rapportés. Dans la majorité des cas, les symptômes régressent spontanément sans avoir recours à un traitement spécifique.

Les symptômes qui apparaissent sont généralement bénins, cependant une hospitalisation peut s'avérer nécessaire pour les cas les plus graves. La déshydratation brutale due aux vomissements et aux diarrhées peut provoquer un état de choc.

La mortalité reste exceptionnelle, elle n'atteint que les individus les plus sensibles à la déshydratation (nourrissons et personnes âgées) et les personnes atteintes d'une pathologie sous-jacente (BERGDOLL, 1979).

*Partie
expérimentale*

Objectifs

Le présent travail a pour objet de rechercher les *Staphylocoques aureus* dans le lait pasteurisé acheté dans plusieurs points de ventes situés dans les localités de Bab Ezzouar et de Dar El Baïda dans la wilaya d'Alger.

Il est composé d'une partie expérimentale où seront développés le matériel et les méthodes utilisées, les résultats obtenus et leur discussion et enfin une conclusion et des recommandations.

Notons que c'est au niveau du laboratoire d'HIDAOA de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire que cette partie s'est déroulée.

2. Matériels et méthodes utilisés

Nous avons analysé 30 échantillons de lait pasteurisé achetés dans différents points de ventes dans les communes de Bab Ezzouar et Dar El Baïda. Les échantillons sont divisés en deux parties égales(15) représentant deux marques de laits différentes les plus commercialisées dans la région, que nous avons nommé laiterie A et B pour éviter la mauvaise publicité.

La période de notre échantillonnage s'est étalée du mois de mars au mois de mai 2016. Les échantillons ont été transportés au laboratoire de L'ENSV en respectant les conditions recommandées (glacière).

1.2 Matériels utilisés

-Bécher 225 ml



Photo 01 : Bécher 225ml (Photo personnelle).

- Pipette pasteur



Photo 2 : Pipette (Photo personnelle).

-Micropipette de 1ml



Photo 03 : Micropipette de 1 ml (Photo personnelle).

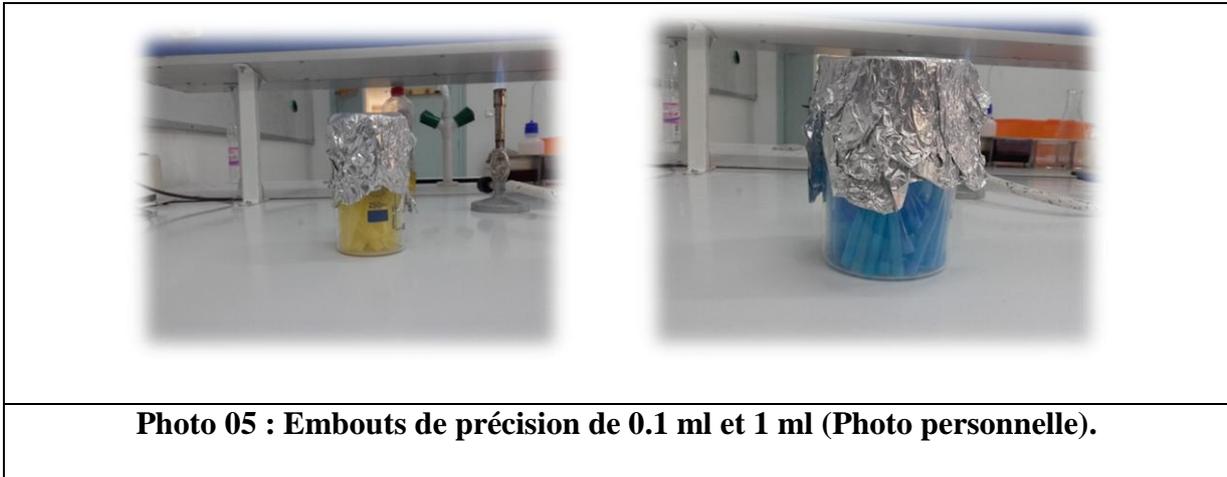
-Micropipette de précision de 0.1ml



Photo 04 : Micropipette de 0.1 ml

(Photo personnelle).

- Embouts



- Bec benzène

- Gélose Beard Parker



Photo 06: Gélose Beard Parker (Photo personnelle).

- Incubateur



Photo 07: Incubateur (Photo personnelle)

-Vortex

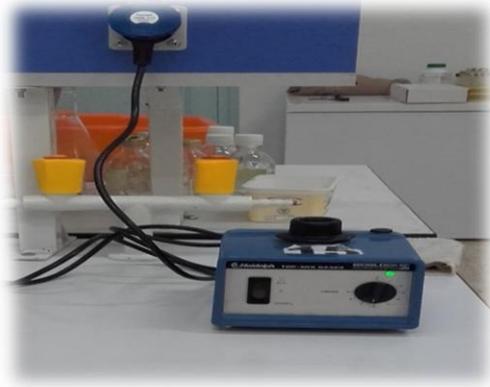


Photo 08 : Vortex (Photo personnelle)

- Tubes de dilution



Photo 09 : Tubes de dilutions (Photo personnelle)

- Echantillon du lait

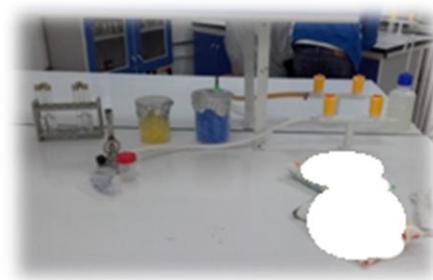


Photo 10 : Echantillons du lait (Photo personnelle).

-Plasma de lapin



Photo 11 : Plasma de lapin (Photo personnelle).

- Eau oxygénée



Photo 12 : Eau oxygénée (Photo personnelle).

-Bouillon cœur-cervelle



Photo 13 : Bouillon cœur-cervelle (Photo personnelle).

2.3 Méthodes de laboratoire employées

- **Préparation des échantillons :**

Après avoir collecté les échantillons, ces derniers ont été acheminés au laboratoire d'HIDAOA de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire d'Alger pour y être analysées selon la norme NF EN ISO 6888-1 relative à la recherche des staphylocoques à coagulas positive.

Après avoir soigneusement lavé et désinfecté le sachet de lait à analysé nous avons rempli devant un bec benzène un bécher stérile de 225 ml, nous avons procédé ensuite de la manière suivante :

-Dilution des échantillons au $1/10^{\text{ème}}$ dans du TSE : Devant un bec benzène, 01 mL de solution mère est prélevé du Becher initial au moyen d'une micropipette et mis dans un tube rempli préalablement avec 9 ml de solution TSE, que nous avons agité à l'aide d'un vortex à ce stade nous avons réalisé la première dilution décimale(10^{-1}), de cette dernière,01 ml est prélevé pour être à son tour dilué au $1/10^{\text{ème}}$ dans du TSE, ce qui constitue la seconde dilution décimale(10^{-2}). De la même façon nous procédons à une dernière dilution (10^{-3}).



Photo 14 : Solution mère utilisée (Photo personnelle).



Photo 15 : Préparation de la 1^{ère} décimale(Photo personnelle).



Photo 16 : Préparation de la 2^{ème} décimale(Photo personnelle).



Photo 17 : Agitation des dilutions(Photo personnelle).

-Etalement ou mise en culture : Afin de réaliser cette étape, nous avons pipeté 0.1 ml de chaque dilution décimale en utilisant une micropipette de précision réglable, la goutte est ensuite déposée dans une boîte de Pétri contenant le Milieu Baird Parker afin d'y être étalée en utilisant un râteau préparé à partir d'une pipette Pasteur , les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h, rappelons cependant qu'une première lecture est faite après 24h d'incubation.



Photo 18 : Prélèvement de chaque dilution(Photo personnelle).



Photo 19 : Etape d'ensemencement (Photo personnelle).



Photo 20 : Préparation de la pipette Pasteur(Photo personnelle).



Photo 21 : Etape d'étalement sur gélose(Photo personnelle).



Photo 22 : Incubation des échantillons(Photo personnelle).

- **Lecture et dénombrement** : cette étape a pour but de rechercher des colonies caractéristiques de *Staphylocoques aureus*. Ne sont prisent en considération que les boites contenant au-delà de 15 colonies et moins de 300 colonies.

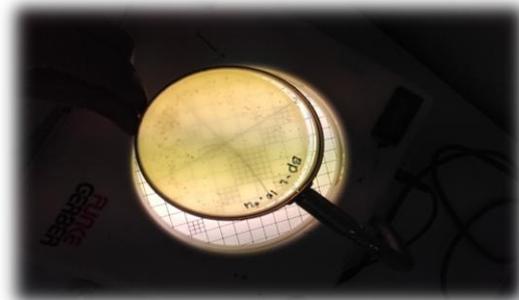


Photo 23 & 24 : Dénombrement des colonies obtenues (Photo personnelle).

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes, entourées d'une auréole d'éclaircissement. Après au moins 24 h d'incubation, peut apparaitre dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies. D'un diamètre de 1 millimètre environ.

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

- Colonies noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit ; la zone claire est absente ou à peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible ;
- Colonies grises dépourvus de zone claire.



Photo 25 : Colonies caractéristiques de *S. aureus* (Photo personnelle).

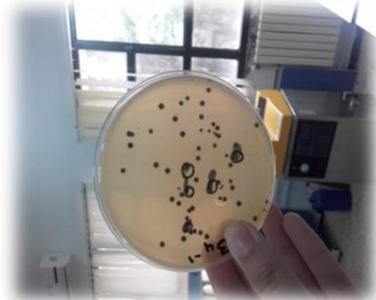


Photo 26 : Colonies non caractéristiques (Photo personnelle).

Après avoir pris l'avis de l'ingénieure de laboratoire et plusieurs microbiologistes nous avons procédé à la purification sur gélose nutritive(GN) de quelques colonies caractéristiques et non caractéristiques afin d'avoir une quantité suffisante pour effectuer les tests de catalase et de coagulase comme le stipule la norme sus- citée.

➤ **Test de Coagulase :**

A partir des boîtes de GN, à l'aide d'une anse de platine, nous avons prélevé une partie de chaque colonie sélectionnée et purifiée et nous l'avons ensemencé dans un tube ou dans un flacon de bouillon cœur-cerveille et incubé à 35°C ou 37° C pendant 24 plus ou moins 2h.

Dans trois tubes Eppendorf stériles, Nous avons ajouté aseptiquement 0.1ml de chaque culture à 0.3 ml de plasma de lapin et incubé à 35°C ou 37°C.

En inclinant le tube, nous avons examiné la coagulation du plasma après 4h à 6h d'incubation et 24h après si le test est négatif.

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



Photo 27 : Prélèvement de plasma de lapin (Photo personnelle).



Photo 28 : Ajout des colonies obtenues (Photo personnelle).



Photo 29 : Incubation du mélange (Photo personnelle).

➤ **Test de catalase**

-Sur une lame nous avons déposé une goutte d'eau oxygénée et nous avons rajouté une partie de la colonie déjà purifiée.

-Dans certains cas les bulles d'air étaient très remarquables contrairement à d'autres

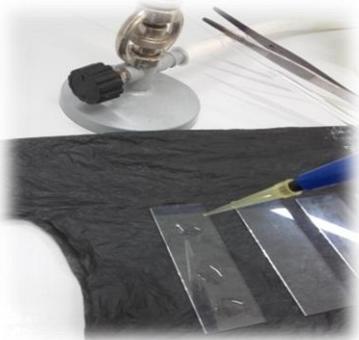


Photo3 0 : Dépôt du H₂O₂ sur lame de microscope(Photo personnelle).



Photo 31 : Absence de bulles d'air(Photo personnelle).

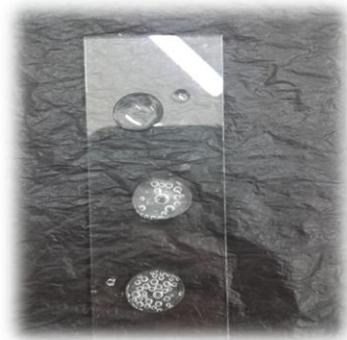


Photo 32 : Présence de bulle d'air(Photo personnelle).

2. Résultats

2.1 Laiterie A

Les résultats obtenus pour la laiterie A sont établis dans le Tableau III et les Figures : III, IV.

Tableau III: Tableau récapitulatif des résultats obtenus de la laiterie A

<i>Echantillons</i>	Colonies caractéristiques			Colonies non caractéristiques			Catalase	Coagulas e
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		
1	0.7	0	0	2,3.10	0.5.10	0.2.10	-	-
2	abs			abs			-	-
3	abs			3.10	1,3.10	0.5.10	-	-
4	abs			abs			-	-
5	abs			abs			-	-
6	abs			abs			-	-
7	abs			abs			-	-
8	abs			abs			-	-
9	abs			abs			-	-
10	abs			abs			-	-
11	6,5.10	6,5.10	1	2.2.10 ²	1,8.10 ²	2,7.10 ²	+	-
12	abs			abs			-	-
13	abs			abs			-	-
14	abs			abs			-	-
15	abs			abs			-	-

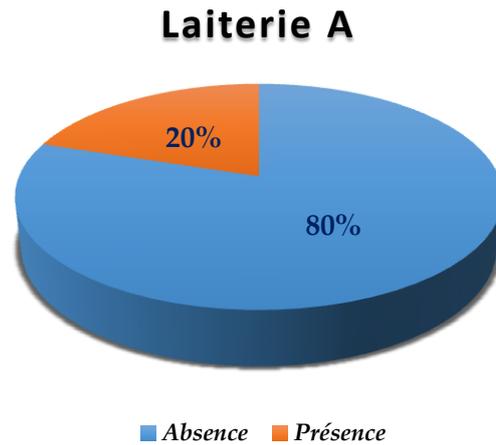


Figure III : pourcentage des échantillons présentant des colonies.

Dans les boîtes de Pétri, des 15 échantillons de la laiterie A il n'y a eu présence de colonies, qu'elles soient caractéristiques ou non caractéristiques, que dans 20%, alors que les 80 % restantes présentaient un nombre de colonies inférieur à 15 (voir annexe n 2:).

2.1.1. Résultats de la coagulase et de la catalase

La figure n°2 ci-dessous représente les résultats obtenus après la réalisation des deux tests, à savoir :

- Le test de la **catalase**.
- le teste de la **coagulase**.

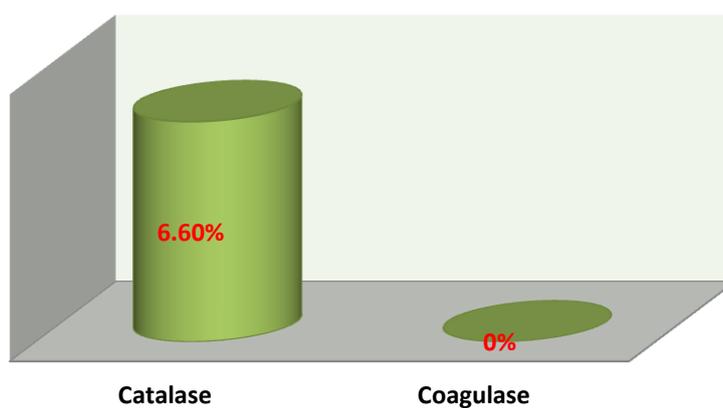


Figure IV: Résultats des testes de catalase et de coagulase de la laiterie A.

6,60% des colonies étaient positifs au test de la catalase alors qu'aucune n'a répondu positivement au test de la coagulase.

2.2 Laiterie B

Les résultats obtenus pour la laiterie B sont établis dans le Tableau IV et les Figures : V, VI.

Tableau IV : Tableau récapitulatif des résultats obtenus de la laiterie B.

Echantillons	Colonies caractéristiques UFC/l			Colonies non caractéristiques UFC/l			Catalase	Coagulase
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
1	abs			abs			-	-
2	abs			6,5.10	3,2.10	1.10	-	-
3	abs			abs			-	-
4	abs			abs			-	-
5	0.5.10	0.1.10	abs	3,3.10	1,6.10	0.8.10	-	-
6	abs			abs			-	-
7	abs			abs			-	-
8	abs			abs			-	-
9	abs			abs			-	-
10	7,1.10	4.10	0.5.10	2.10 ²	1,57.10 ²	2,5.10	+	-
11	abs			abs			-	-
12	abs			abs			-	-
13	abs			abs			-	-
14	abs			abs			-	-
15	abs			abs			-	-

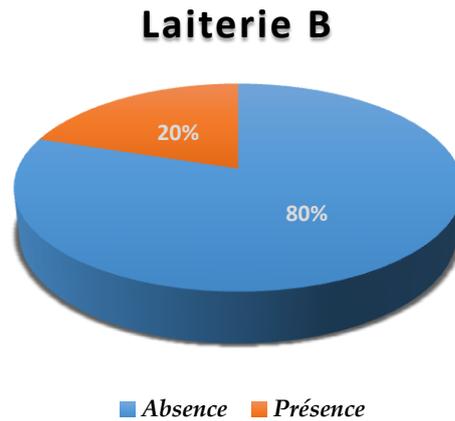


Figure V : pourcentage des échantillons présentant des colonies.

Sur les 15 échantillons analysés seulement 3 ont montré la présence de colonies caractéristiques et /ou non caractéristiques ce qui représente un pourcentage de 20% .

2.2.1. Résultats de la coagulase et de la catalase

La figure IV ci-dessous représente les résultats obtenus après la réalisation des deux tests, à savoir :

- Le test de la **catalase**.
- le test de la **coagulase**.

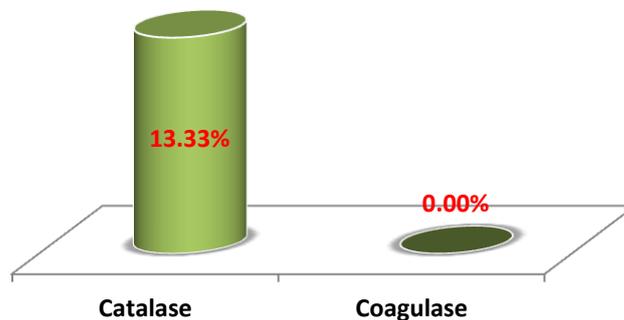
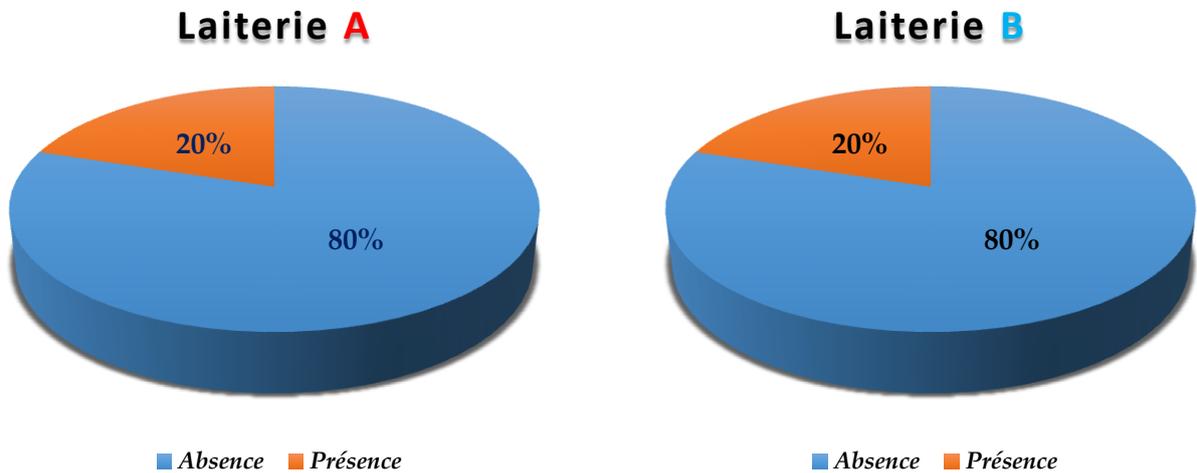


Figure VI: Résultats des tests de catalase et de coagulase de la laiterie B.

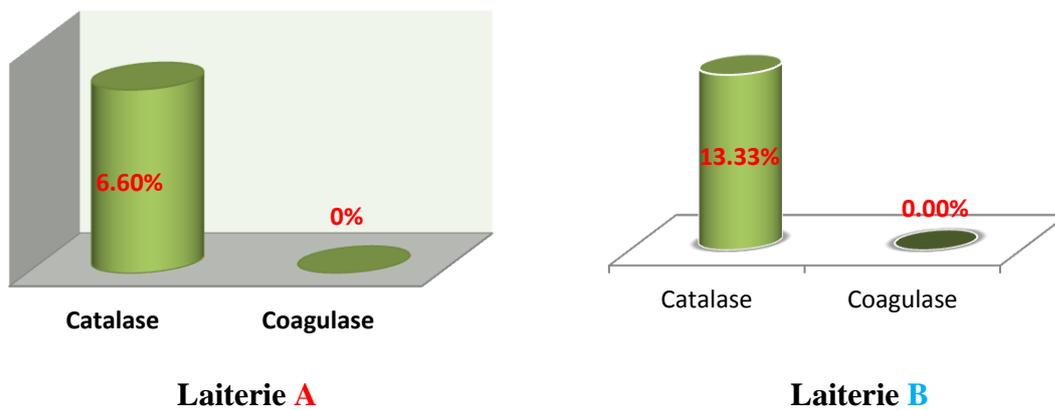
Pour le test de catalase 13.33% des résultats était positif, alors que les résultats du test de coagulase étaient tous négatif 0%.

- Etude comparative entre les deux laiteries



Les taux obtenu dans chaque laiterie sont identiques 20% d'échantillons contaminés.

Etude comparative entre les résultats obtenus des tests de catalase et de la coagulase des deux laiteries.



✓ **Test de catalase :**

La laiterie A présentait 6.60% de résultats positif alors que la laiterie B présentait 13.33%.

✓ **Test de coagulase :**

Ce test n'a révélé aucun résultat positif dans les deux laiteries.

3. Discussion des résultats :

- ✓ Sur les 15 échantillons de chaque laiterie 20% présentaient des colonies caractéristiques et /ou non caractéristiques alors que le lait pasteurisé est sensé ne contenir aucun germe, ce qui pourrait s'expliquer par la présence éventuelle de micro trous dans les sachets qui provoquerait l'entrée des germes dans le lait préalablement pasteurisé., nous pouvons expliquer aussi cela par des défaillances momentanées de la machine à ultra violets qui stérilise les sachets.

La mal fermeture des sachets et la présence de Souillures dans les caisses d'entreposage pourraient aussi en être la cause.

Concernant les tests de la coagulase :

- toutes les colonies testées étaient coagulases négative ce qui montre que les colonies caractéristiques et /ou non caractéristiques retrouvées ne sont pas des *Staphylococcus aureus* mais d'autres espèces de staphylococcus tels que
 - S. chromogenes.
 - S. épidermidis.
 - S. haemolyticus.
 - S. pasteurii.

nos résultats sont similaire à ceux retrouvés au Burkina Faso par SISSAO et *al* en 2015 ,KABIR et *al* en 2014et KRIOU et KASRIA en 2015. Ils montrent que dans les deux laiteries la pasteurisation est bien appliquée sachant que la charge microbienne initiale est faible car la poudre utilisée est préalablement stérilisée et la recherche des staphylococcus *aureus* dans l'eau n'est pas demandée (absence) et les deux laiteries utilisent ces composants pour la reconstitution de leur lait contrairement à d'autres qui font l'intégration de lait cru.

Concernant les tests de catalases

Sur les 15 échantillons de la laiterie A et les 15 échantillons de la laiterie B nous avons eu respectivement 6.60% et 13.33% de résultats positif pour le test de la catalase ce qui s'explique par le fait que les staphylococcus *aureus* ne sont pas les seules staphylocoques à

être catalase positive ,mais pour dire que c'est des staphylococcus aureus il faut que les deux tests(coagulase et catalase) et une coloration de gram soient positifs.

Etude comparative entre les deux laiteries

La similitude de nos résultats s'explique par l'utilisation du même mode de reconstitution (poudre ,eau) ce qui limite la contamination initiale et éventuellement par le nettoyage régulier des tanks de lait en sachant qu'une bonne pasteurisation élimine la quasi-totalité des germes. La contamination de 20% des échantillons par des Staphylocoques à coagulase négative n' a probablement eu lieu qu'après la pasteurisation.

4. Conclusion

Le présent travail a eu pour objectif de rechercher les *Staphylococcus aureus* dans le lait pasteurisé commercialisé dans la région d'Alger (Dar El Baida et Bab Ezzouar), en nous basant sur des normes de recherche microbiologique (ISO 6888-1).

Sur les 30 échantillons analysés 20% présentaient des colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques, mais la confirmation par les tests de catalase et de coagulase a révélé qu'aucun échantillon ne présentait de *Staphylococcus aureus* ce qui est rassurant quand à la bonne pasteurisation du lait.

La présence de ces colonies peut être expliquée par la contamination de nos échantillons par d'autres espèces de *Staphylococcus* à coagulase négative ayant contaminée le lait après sa pasteurisation.

5. Recommandation

Afin d'assurer un lait de bonne qualité bactériologique nous devons agir :

➤ **Au moment de la fabrication, en s'assurant :**

- ❖ que les sachets de poudre soit hermétiquement fermés et donc bien stériles.
- ❖ D'éviter d'ouvrir les sachets de poudre avec du matériel souillé.
- ❖ Que l'eau utilisée soit bien traitée.
- ❖ Que les citernes et les tanks de mélange soient nettoyés et désinfectés régulièrement.
- ❖ De Bien stériliser les sachets et assurer leur bonne fermeture afin d'éviter toute contamination externe.
- ❖ Il est préférable d'emballer le lait dans des bouteilles.
- ❖ de transporter les sachets de lait dans des conditions respectant les bonnes pratiques d'hygiène.

➤ **Au niveau des points de ventes :**

- ❖ Nous recommandons de mettre les sachets dans des caisses propres et de bien les entreposer, ainsi que de trier les sachets troués et les éliminer pour ne pas contaminer le reste ;
- ❖ Veiller à ce que les sachets soient gardés au frais et non à une température ambiante.

➤ **Avant la consommation :**

- ❖ Veiller à bien laver les sachets de lait pasteurisé avant leur ouverture afin d'éviter toute contamination ;
- ❖ Maintenir les sachets au réfrigérateur ;
- ❖ Faire bouillir le lait avant consommation ;

Annexes

Annexe 01

Milieu gélosé de Baird Parker

Milieu de base

Composition :

Digestat pancréatique de caséine	10.0
Extrait de levure	1.0 g
Extrait de viande	5.0 g
Pyruvate de sodium	10.0 g
L-Glycine	12.0 g
Chlorure de lithium	5.0 g
Agar-agar	12 g à 22 g
Eau, pour obtenir volume final de	1000 ml

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition ;

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit 7.2 +/- 0.2 à 25°C ;

Répartir le milieu, par quantité de 100 ml, dans des flacons ou fioles (6.5) de capacité appropriée ;

Stériliser le milieu à 121°C pendant 15 min ;

Solutions

Solution de tellurite de potassium

Composition

Annexes

Tellurite de potassium a (K_2TeO_3)	1.0 g
Eau	100 ml

Il est recommandé de s'assurer au préalable que le tellurite de potassium dont on dispose convient pour cet essai

Préparation

Dissoudre complètement le tellurite de potassium dans l'eau, en chauffant le moins possible.

Il convient que la poudre soit rapidement soluble. Si un composé blanc insoluble est présent dans l'eau, ne pas retenir la poudre.

Stériliser par filtration sur membrane de 0.22 μ m de porosité.

La solution peut être conservée maximum 1 mois à $+3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

Éliminer la solution si un précipité blanc se forme.

Emulsion de jaune d'œuf (à une concentration d'environ 20% ou selon les instructions du fabricant)

Utiliser des œufs frais de poule à coquille intacte. Nettoyer les œufs avec une brosse à l'aide d'un détergent liquide. Les rincer à l'eau courante puis désinfecter les coquilles, soit en les plongeant dans l'éthanol à 70% (fraction volumique) pendant 30 s et les laissant sécher à l'air, soit en les pulvérisant d'alcool suivi de flambage.

En opérant de façon aseptique, casser chaque œuf et séparer le jaune du blanc par transferts répétés du jaune d'une demi-coquille dans l'autre. Placer les jaunes dans un flacon stérile et ajouter quatre fois leur volume d'eau stérile. Mélanger vigoureusement. Chauffer le mélange dans le bain d'eau. Régler à 47°C pendant 2h et entre poser à $+3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 18h à 24h pour laisser se former un précipité. Recueillir aseptiquement le liquide surnageant dans un flacon récemment stérile pour l'utilisation. L'émulsion peut être conservée 72h au maximum à $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

Annexes

✓ Préparation des boîtes de milieu gélosé

Couler la quantité nécessaire du milieu complet, dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur de gélose d'environ 4 mm, et laisser de solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, 24h au maximum à + 3°C +/- 2°C.

Note pour la durée de conservation de boîtes préparées industriellement, il convient de suivre les instructions du fabricant avant l'utilisation, sécher les boîtes, de préférence avec le couvercle enlevé, et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve réglée entre 25°C et 50°C. Jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu.

• Bouillon cœur cervelle(BHIB).

a. Composition :

Digestats enzymatiques de tissus animaux	10.0 g
Extrait déshydraté de cervelle de veau	12.5 g
Extrait déshydraté de cœur de bœuf	5.0 g
Glucose	2.0 g
Chlorure de sodium	5.0 g
Hydrogénorthophosphate disodique anhydre (Na ₂ HPO ₄)	2.5 g
Eau	1000 ml

b. Préparation :

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Ajusté le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7.4 +/- 0.2 à 25°C.

Répartir le milieu de culture, par quantité 5 ml à 10 ml, dans des tubes ou fioles (6.5) de capacité appropriées.

Stériliser le milieu à 129°C pendant 15 min.

• Plasma de lapin

-Utiliser un plasma déshydraté de lapin, disponible dans le commerce, et le réhydrater en se conformant aux instructions du fabricant ;

Annexes

-Si l'on ne peut se procurer du plasma de lapin déshydraté, diluer un plasma de lapin frais et stérile à 1 volume pour 3 volumes d'eau stérile ;

-Si du citrate de potassium ou du citrate de sodium a été utilisé comme anticoagulant du plasma ajouter une solution d'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) de manière à avoir 0.1% d'EDTA dans le plasma réhydraté ou dilué ;

-A défaut d'instruction du fabricant, le plasma réhydraté ou dilué doit être utilisé extemporanément ;

-Avant utilisation, contrôler chaque lot de plasma avec des souches de staphylocoques à coagulase positive ainsi qu'avec des souches de staphylocoques à coagulase négative.

Annexes

Annexe 2

Mode opératoire selon l'ISO 6888-1

1. Prise d'essai, suspension mère et dilutions

ISO et la norme spécifique du produit concerné

2. Ensemencement

- Transférer à l'aide d'une pipette stérile 0.1 ml de suspension mère (dilution 10^{-1}) à la surface de chacune de deux boîtes de milieu gélosé. Répéter l'opération avec la dilution 10^{-2} et 10^{-3} ;
- Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface de milieux gélosés en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'épandeur, laisser sécher les boîtes avec leurs couvercles en place, pendant environ 15 min à la température ambiante.

3. Incubation

Incuber les boîtes pendant 24h +/- 2h, puis les ré-incuber pendant d'autres 24h +/- 2h supplémentaires à l'étuve à 37°C.

4. Sélection des boîtes et interprétation

Après 24h d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les positions des colonies caractéristiques éventuellement présentes.

Incuber à nouveau toutes les boîtes à 35°C ou à 37°C durant 24h +/- 2h supplémentaires et marquer les nouvelles colonies caractéristiques. Marquer également les colonies non caractéristiques éventuellement présentes.

Ne retenir pour le dénombrement que les boîtes renfermant au maximum 300 colonies dont 150 colonies caractéristique et/ou non caractéristiques au niveau de deux dilutions successives.

Il faut qu'une des boîtes renferme au moins 15 colonies. Choisir en vue de la confirmation un nombre déterminé (en général 5 colonies caractéristiques s'il n'y a que des colonies caractéristiques, ou 5 colonies non caractéristiques s'il n'y a que des colonies non caractéristiques, ou 5 colonies caractéristiques et 5 colonies non caractéristiques, si les deux types sont présents, à partir de chaque boîte.

Annexes

Si il y a moins de 15 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques sur les boites ensemencées avec un produit liquide non dilué ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits ,il est possible de faire une estimation.

Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes , entourées d'une auréole d'éclaircissement. Apres au moins 24 h d'incubation, peut apparaitre dans cette zone claire un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

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

- a) Colonies noires et brillantes avec ou sans bord blanc étroit ; la zone claire est absente ou a peine visible et l'anneau opalescent est absent ou à peine visible
- b) Colonies grises dépourvus de zone claire

Les colonies non caractéristiques sont surtout formées par des souches de staphylocoques positive contaminant par exemple, les produits laitiers, les crevettes et les abats. Elles sont moins souvent produites par les souches de staphylocoques à coagulasse positive qui contaminent les autres produits.

Des bactéries appartenant à des genres autres que les staphylocoques peuvent former des colonies d'aspect similaire à celui des staphylocoques. Un examen microscopiques d'une coloration de Gram et une recherche de catalase, avant confirmation permettront de distinguer les autres genres des staphylocoques. Les staphylocoques sont des coques à gram + et possédant une catalase.

Si 1.0 ml d'inoculum a été réparti sur trois boites. Effectuer les opérations de dénombrement et de confirmation sur l'ensemble de ces boites comme s'il s'agissait d'une seule boite.

Pour faire une estimation de petits nombres de Staphycoques à coagulasse positive, retenir toutes les boites qui contiennent des colonies caractéristiques et non caractéristiques. Retenir toutes ces colonies en vue de la confirmation sans sortir des limites fixées ci-dessus.

5. Confirmation (recherche de la coagulation)

A l'aide d'un fil stérile (6.7), prélever une partie de chaque colonie sélectionnée et l'ensemencer dans un tube ou dans un flacon de bouillon cœur-cervelle. Incuber à 35°C ou 37°C pendant 24 plus ou moins 2h.

Annexes

Test de la coagulase :

- Ajouter aseptiquement 0.1ml de chaque culture à 0.3 ml de plasma de lapin dans des tubes stériles à hémolyse ou flacons et incuber à 35°C ou 37°C.
- En inclinant le tube, examiner la coagulation du plasma après 4h à 6h d'incubation et si, le test est négatif, et réexaminer après 24h d'incubation.
- considérer que la réaction à la coagulase est positive quand le coagulum occupe plus que la moitié du volume initialement occupé par le liquide.
- A titre de contrôle négatif, ajouter pour chaque lot de plasma 0.1ml de bouillon cœur-cerveille stérile à la quantité recommandée de plasma de lapin et incuber sans ensemencement. Pour que la réaction soit valable, le plasma du tube témoin ne devra pas montrer de signes de coagulation.

1. **AKINEDEN O., ANNEMULLER C., HASSAN A. A., LAMMLER C., WOLTER W., ZSCHOCK M., (2001).** Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 5, pp:959-964.
2. **ANONYME1:**<http://morningreporttwh.blogspot.com/2015/06/sab-staphylococcus-aureus-bacteremia.html>
3. **ANONYME 2:** <http://thesesante.ups-tlse.fr/556/1/2014TOU32073.pdf>
4. **BERGDOLL M.S. (1979).** Staphylococcal intoxications. In: Riemann H, Bryan FL. Food-borne infections and intoxications. Academic press New York, pp:443-494.
5. **BERGMANN, J.F. WIESBADEN. In : HENNEKINNE J.A (2009).** Nouvelles Approches Pour La Caracterisation Des Toxi Infections Alimentaires a *Staphylocoques* a Coagulase Positive. Agro Paris Tech.
6. **BLAIR J.E., WILLIAMS R.E, (1961).** Phage-typing of staphylococci. *Bull. W.H.O.*, 24, pp:771-784.
7. **BOUTONNIER A., NATO F., BOUVET A., LEBRUN L., AUDURIER A., MAZIE J. C., FOURNIER, J. M., (1989).** Direct testing of blood culture for detection of the serotype 5 and 8 capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 5, pp :989-993.
8. **BRETT M.M.(1998).** Kits for the detection of some bacterial food poisoning toxins: problems, pitfalls and benefits. *J Applied Microbiology Symposium Supplement.*, 84, pp:110-118.
9. **BRYAN F., GUZEWICH J., TOLD E .(1997).** Surveillance of foodborne disease II. Summary and presentation of descriptive data and epidemiologic patterns; their value and limitation. *J Food Prot*, 60 pp:567-578.
10. **CODEX ALIMENTARIUS, 2011**
11. **COSTERTON J.W., LEWANDOWSKI Z.(1995).** Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 49: pp711-745.
12. **COSTERTON J.W., STEWART PS., GREENBERG EP.(1999).** bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318-1322.
13. **DE BUYSER M.L., MORVAN A., GRIMONT F., EL SOLH N., (1989).** Characterization of *Staphylococcus* species by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J Gen Microbiol.*, 135, 4, pp989-999.
14. **DE BUYSER M.L., SUTRA L.(2005).** *Staphylococcus aureus*. In : Federighi M. Bactériologie alimentaire-compendium d'hygiène des aliments (2eme éd). Economica, Paris, pp25-51.
15. **DELAFUENTE R, SUAREZ G, SCHLEIFER K.H., (1985).** *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius* subsp. nov., the causal agent of abscess disease of sheep. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, pp99-102.
16. **DELMAS G., GALLAY A., ESPIRE A., HAEGHEBAERT S., PIHIER N., WEILL F.X., DE VALK H., VAILLANT V., DZSENCLOS J.C.(2006).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *BEH*, pp 51-52 pp:418-422.

17. **DONLAN R.M. (2002).** Biofilms : microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8 pp:881-890.
18. **DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHKEUFER KH., STACKEBRANDT E.(2006)** The Prokaryotes: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria. 3eme éd. ;Springer, New-York, Vol 4, Chap.1.2.1. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*, pp4-75.
19. **GAURSAUD J. (1985).** Composition et propriétés physico-chimique. In :LUQUET F.M. Lait et produits laitiers, 1ère édition. Paris :technique et documentation .Lavoisier, Vol1, chap1. p.90.
20. **HANZEN CH. (2005-2006).** Pathologies infectieuses de la glande mammaire. Chapitre 24, 2eme doctorat 2005-2006 :p45. www.fmv.ulg.ac.Be/oga/index.
21. **HANZEN CH., (2009-2010).** La pathologie infectieuse de la glande mammaire. Etiopathogénie et traitements. Approche individuelle et de troupeau. P63.
22. **HANZEN CH., CASTAIGNE J. LOUP. (2002).** Faculté de médecine vétérinaire. Université de Liege, chapitre 30 : pathologie infectieuse de la glande mammaire, site web : www.fmv.ulg.ac.Be/oga/index.
23. **HARVEY J., GILMOUR A. (2000).** *Staphylococcus aureus* In : Batt CA, Patel PD. Encyclopedia of food. Academic press, London, 2066-2071.
24. **HENNEKINNE J-A, (2009).** Croissance de *S. aureus* et production d'entérotoxines : du bon respect de la chaîne du froid pour éviter les épisodes toxiques alimentaires. Revue générale du froid et du conditionnement d'air, Janvier/février 2009, pp57-61.
25. **JAMES M., JAY., MARTIN.J., LOESSNER.DAVID A., GOLDEN.(2005).** Modern food microbiology. Springer science. p.149.
26. **JEFFERSON K.K.(2004).** What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol Lett* , 236pp:163-173.
27. **JEFFERSON K.K., Cramton S.E., Gotz F., Pier G.B.(2003).** Identification of a 5-nucleotide sequence that controls expression of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus* and characterization of the DNA-binding properties of IcaR. *Mol Microbiol*, 48pp:889-899.
28. **KARAKAWA W.W., FOURNIER J.M., VANN F., ARBEIT R., SCHNEERSON R.S., ROBBINS J.B., 1985.** Method for the serological typing of the capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 22, 3, pp : 445-447.
29. **KRIOU H KASRIA O. (2015).Thèse de Master :** Influence De la température de stockage sur la qualité du lait de vache (Lait entier, partiellement écrémé et écrémé) pasteurisé conditionné et le lait reconstitué conditionné. 68.
30. **LAUSANE.(1969).** Le lait.
31. **LE LOIR Y.,GAUTHIER M. (2010).** *Staphylococcus aureus* édition TEC et DOC .P283.
32. **LEVESQUE P(2006).** Le producteur du lait Québécois. pp.30-33.
33. **POUTREL B., (1985).** Généralités sur les mammites de la vache laitière. Processus infectieux , épidémiologie, diagnostique, méthode de contrôle . les mammites bovines. Recueil de médecine vétérinaire , pp161,617,pp495-512.

34. **PREVOST G., JAULHAC B., PIEMONT Y., (1992).** DNA fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis is more effective than ribotyping in distinguishing among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. J. Clin. Microbiol., 30, 4, 967-973.
35. **ROSENBAACH, F.J., (1884).** Microorganismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des Menschen.
36. **RUZICKOVA V., KARPISKOVA R., PANTUCEK R., POSPISILOVA M., CERNIKOVA P., DOSKAR J., (2008).** Genotype analysis of enterotoxin H-positive *Staphylococcus aureus* strains isolated from food samples in the Czech Republic. Int. J. Food Microbiol., 121, 1, 60-65.
37. **SCHLICHTING C., BRANGER C., FOURNIER J. M., WITTE W., BOUTONNIER A., WOLZ C., GOULLET P., DORING G.(1993).** Typing of *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis, zymotyping, capsular typing, and phage typing: resolution of clonal relationships. J Clin Microbiol., 31, 2, 227-232.
38. **SHIRTLIFF M.E.,MADER J.T.,CAMPER A.K.(2002).** Molecular interactions in biofilms.Chem Biol,9:859-871.
39. **SISSAO M., MILLOGO V., OUEDRAOGO G.A.(2015).** Thèse :Composition chimique et qualité bactériologique des laits crus et pasteurisés au Burkina Faso.
40. **STOODLEY P.,SAUER K.,DAVIES D.G.,COSTERTON JW.(2002).**biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol,56:187-209.
41. **Tamime A-Y. (2009).** Milk processing and quality Management .First publication Black. Well. Publishing Ltd., USA .
42. **TSEN H.Y., YU G.K., HU H.H., (1997).** Comparison of type A enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from geographically far distant locations by pulsed field gel electrophoresis. J. Appl. Microbiol., 82, 4, 485-493.
43. **VANDERLINDE P.B., FEGAN N., MILLS L., DESMARCHELIER P.M., (1999).** Use of pulse field gel electrophoresis for the epidemiological characterisation of coagulase positive *Staphylococcus* isolated from meat workers and beef carcasses. Int J Food Microbiol., 48, 2, 81-85.
44. **VIGNOLA C.L. (2002).**Sciences et technologie du lait ;Transformation du lait :Ecole polythèque de Montréal.,p.292-309.
45. **WIENEK A.A.(1991).** Comparison of four kits for the detection of Staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. Int J Food Microbiol.,14,305-312.