

Chapitre III

Matériel et méthodes

1. Zone d'étude

La wilaya de Djelfa est située dans la partie nord-centrale de l'Algérie au-delà des piémonts sud de l'atlas tellien en venant du nord dont le chef-lieu de la wilaya et à 300 kilomètres au sud de la capitale. Elle est comprise entre 2 et 5° de longitude et entre 33 et 35° de latitude nord. Erigée au rang de Wilaya à la faveur du découpage administratif de 1974, cette partie du territoire couvre une superficie totale de 32.256,35 km² et représente 1,36% de la superficie totale du pays. Elle se compose actuellement de 36 communes regroupées en 12 Daïrates.

Dans cette région steppique, l'élevage bovin est peu pratiqué par rapport à celui des petits ruminants (ovins et caprins). La wilaya dispose d'un effectif bovin total estimé à 30 750 têtes dont 14 220 sont des vaches laitières (soit 46,24%). Ces dernières sont représentées par trois variétés de bovins : le laitier moderne (BLM) présent à 16,10% du total (2290 têtes), le laitier amélioré (BLA) et le bovin laitier local (BLL) regroupant 11 930 têtes (soit 83,89%) (DSA, 2014).

2. Pré-enquête

La première partie de l'étude consiste en une analyse de l'organisation de la filière lait dans la région de Djelfa. Une pré-enquête nous a d'abord permis de constituer une image de la filière notamment des flux de distribution du lait cru. Par la suite, des entretiens ont été réalisés auprès des différents acteurs de la filière (éleveurs, collecteurs, commerçants et transformateur) en vue de la réalisation de la collecte des différents prélèvements.

3. Echantillonnage

L'étude a été menée sur un total de 150 échantillons de lait cru et de ses produits répartis inégalement à travers les deux types de dispositifs de mise en marché et de distribution du lait et des produits laitiers dans la ville de Djelfa : le dispositif formel représenté par le lait issu des entreprises de transformation, et le dispositif informel représenté par le lait et ses dérivés « L'ben » (lait fermenté écrémé traditionnel) et « J'ben » (fromage frais traditionnel), issus des laiteries urbaines traditionnelles « mahlabas » et vendus directement aux consommateurs.

Dans le but de constituer un échantillon qui reflète fidèlement sa composition et sa complexité, deux méthodes d'échantillonnage probabiliste ont été utilisées, à savoir, l'échantillonnage stratifié et l'échantillonnage aléatoire simple.

a. L'échantillonnage stratifié : Il consiste à subdiviser la population sujette de l'étude en deux sous-populations différentes (strates) qui partagent les mêmes caractéristiques (TRIOLA, 2006). La première strate est incluse dans la filière informelle alors que la deuxième est imbriquée dans la filière formelle (figure 18).

b. L'échantillonnage aléatoire simple : Il consiste à choisir, au sein de chaque strate, des individus de telle sorte que chaque membre de la population a une chance égale de figurer dans l'échantillon (TRIOLA, 2006).

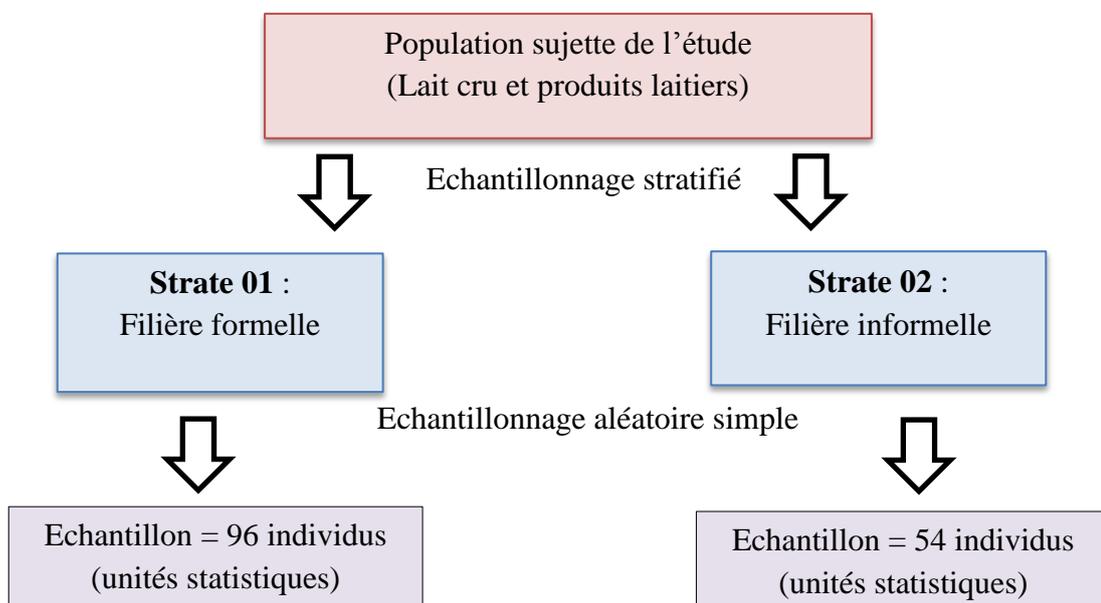


Figure 18 : Plan de procédure d'échantillonnage.

3.1. Strate de la filière formelle

Les premières observations de la chaîne de production du lait ont permis de constituer la base du plan d'échantillonnage de cette strate. De ce fait, cinq niveaux d'échantillonnage sont retenus : lait individuel, lait de mélange « chariot trayeur, cuve de réfrigération, camionnette de collecte et l'unité de pasteurisation ». Les éleveurs ont été soumis à un questionnaire dans le but de s'informer sur la gestion de l'hygiène instaurée lors de la traite mais aussi lors des opérations ultérieures (annexe I).

Les critères de choix des fermes proviennent aussi des observations de la première phase de l'étude : il s'agit de choisir des élevages adhérents au programme de l'ONIL et disposant de cuves de réfrigération. Le choix a aussi tenu compte de la facilité d'accès.

3.1.1. Au niveau de la ferme:

Pour estimer le niveau et l'évolution du taux de contamination microbienne du lait, 6 prélèvements sont effectués au niveau de chaque ferme, 4 prélèvements de lait individuels provenant de la traite mécanique contre deux prélèvements de lait de mélange (chariot trayeur et cuve de réfrigération).

3.1.2. Au niveau de l'unité de transformation:

Pour suivre l'évolution microbienne du lait jusqu'au stade final de la chaîne de production, 2 prélèvements du lait sont effectués au niveau de l'unité de pasteurisation : un prélèvement provenant de la camionnette de collecte juste à l'entrée de l'unité et un autre à sa sortie de l'unité (après pasteurisation).

Dans le but de suivre la contamination microbienne du lait dans le temps, on a fait appel, au niveau de cette strate, à une autre variété d'échantillonnage probabiliste : l'échantillonnage systématique « périodique » (TRIOLA, 2006). Il a consisté à définir notre population d'échantillons à intervalles réguliers, le long d'un axe temporel de 10 jours, à partir d'un premier point choisi au hasard pour une période de deux mois (à raison de 3 prélèvements par mois).

La situation géographique des deux élevages concernés par l'échantillonnage ainsi que le protocole de prélèvement sont visualisés respectivement sur les figures 19 et 20.

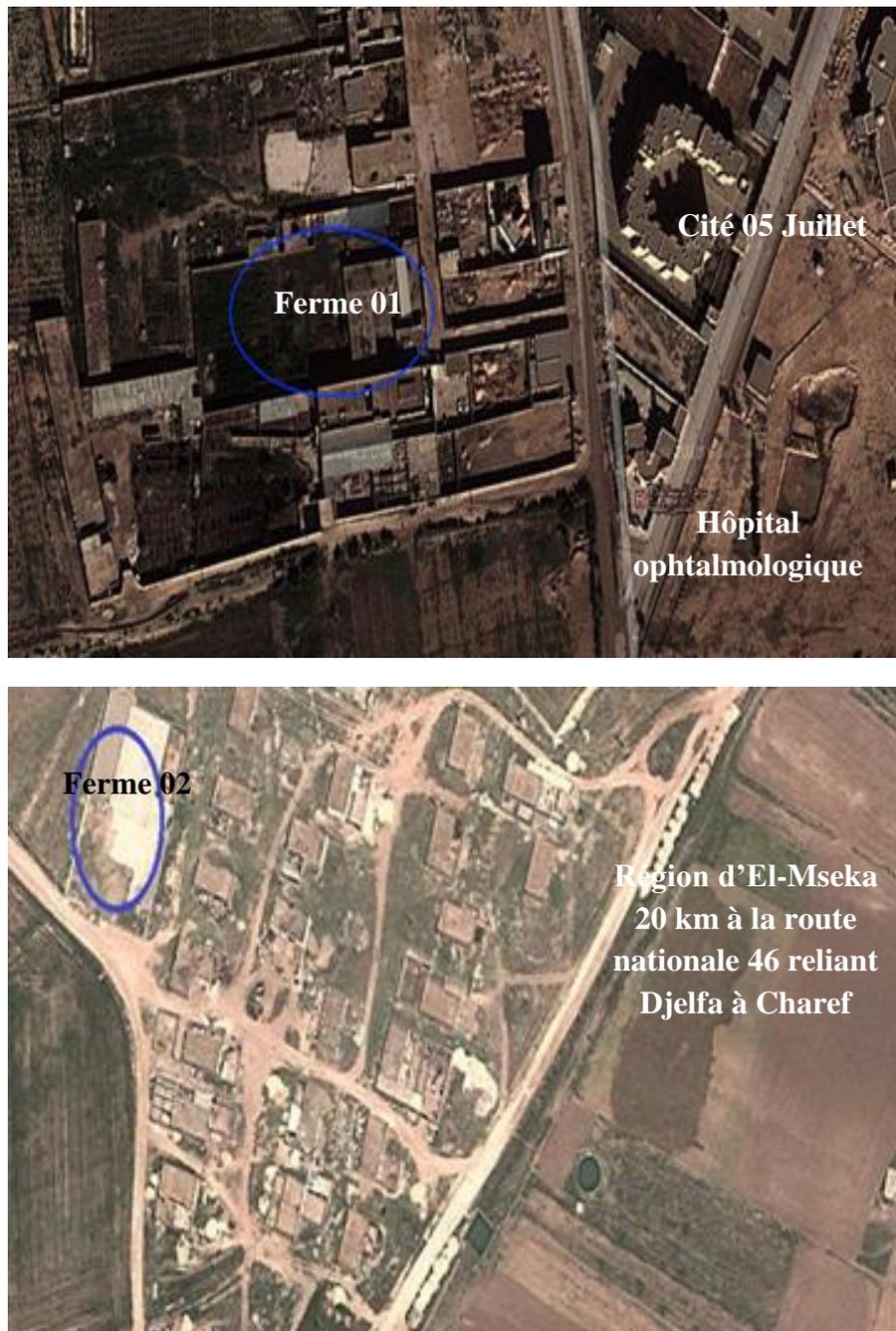


Figure 19 : Images satellitaires établies par Google Earth montrant la situation géographique des deux fermes retenues dans l'étude.

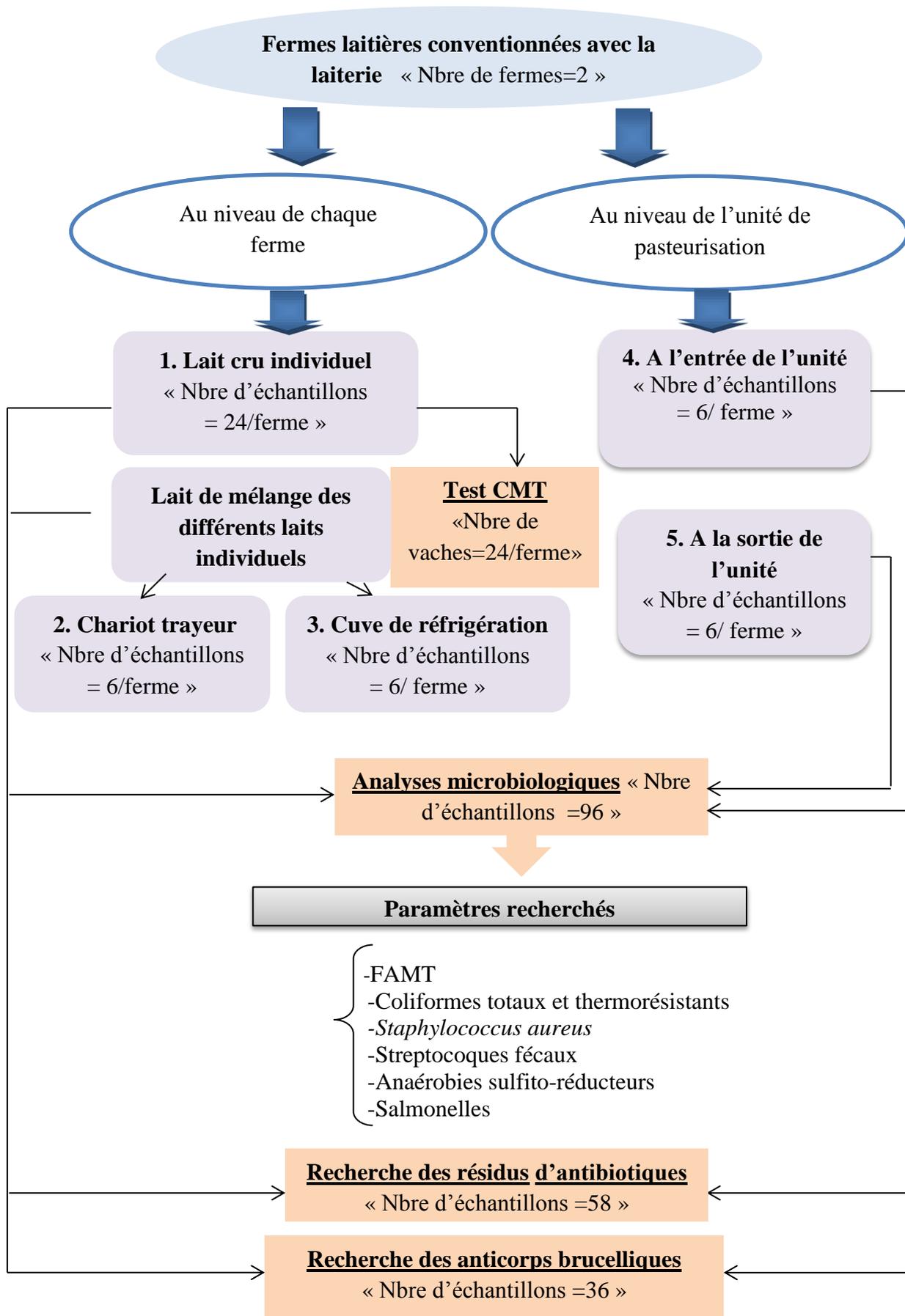


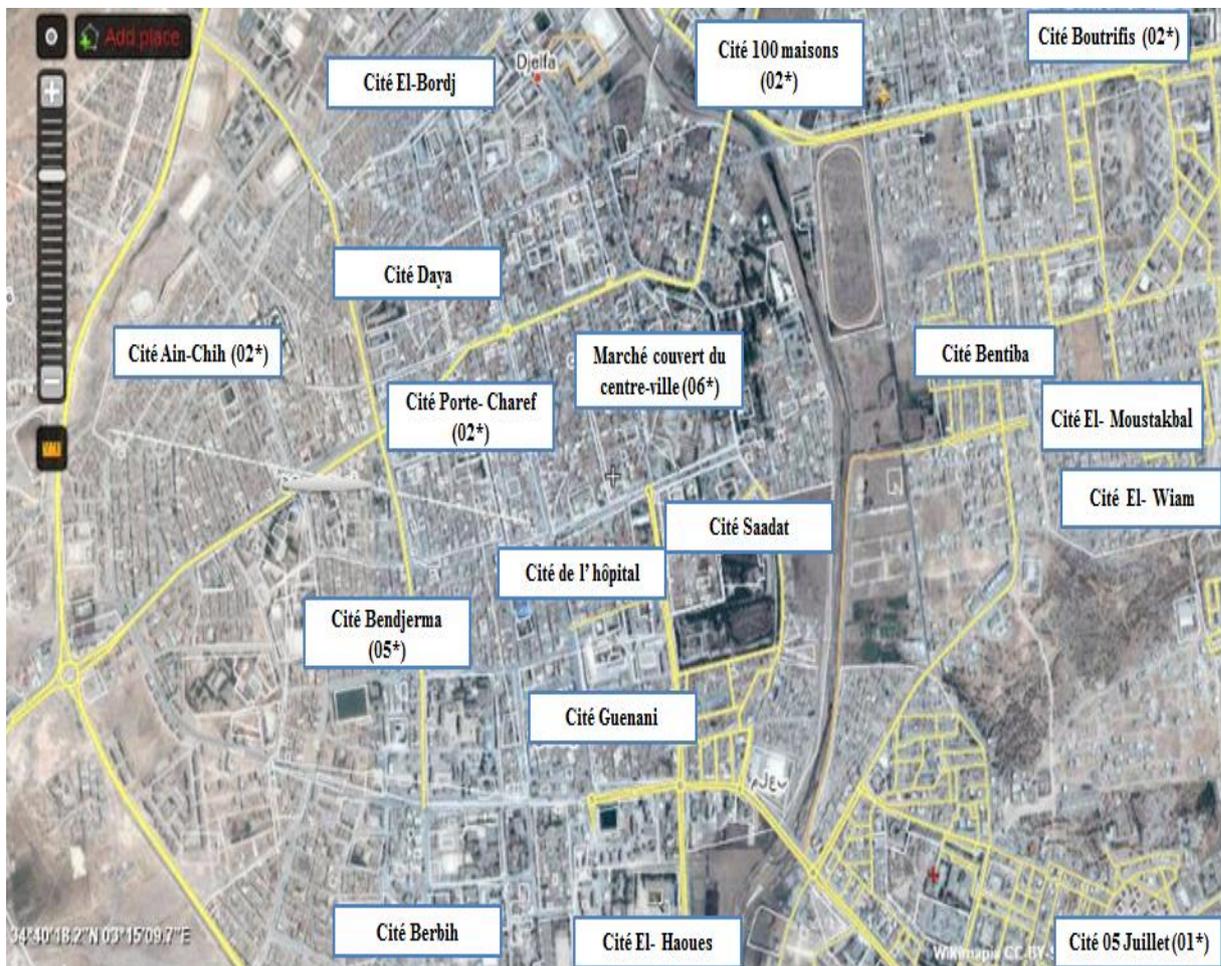
Figure 20: Organisation des cinq niveaux d'échantillonnage dans la sous-filière formelle.

3.2. Strate de la filière informelle

Le point de vente du lait et des produits laitiers traditionnels, reconnus dans notre langage courant sous la dénomination de « lebben », représente la porte d'entrée de cette sous-filière. De ce fait, 20 points de vente fixes sont retenus avec une pré-enquête sur les fermes d'approvisionnement, le procédé de fabrication, l'horaire d'arrivée du lait.

Les critères de choix tiennent compte des quartiers les plus peuplés de la ville ainsi que les magasins ayant les ventes les plus élevées. Au total, cinquante-quatre échantillons sont prélevés tels qu'ils sont vendus au consommateur, dont un tiers de lait cru de vache commercialisé, un tiers de « L'ben » et un tiers de « J'ben ».

La situation géographique des crémèries concernées par l'échantillonnage ainsi que le protocole de prélèvement sont montrés respectivement sur les figures 21, 22.



(*) : Crémèries ciblées par l'étude (Nbre=20).

Figure 21 : Image satellitaire établie par Google Earth montrant la situation géographique des différentes crémèries retenues dans l'étude.

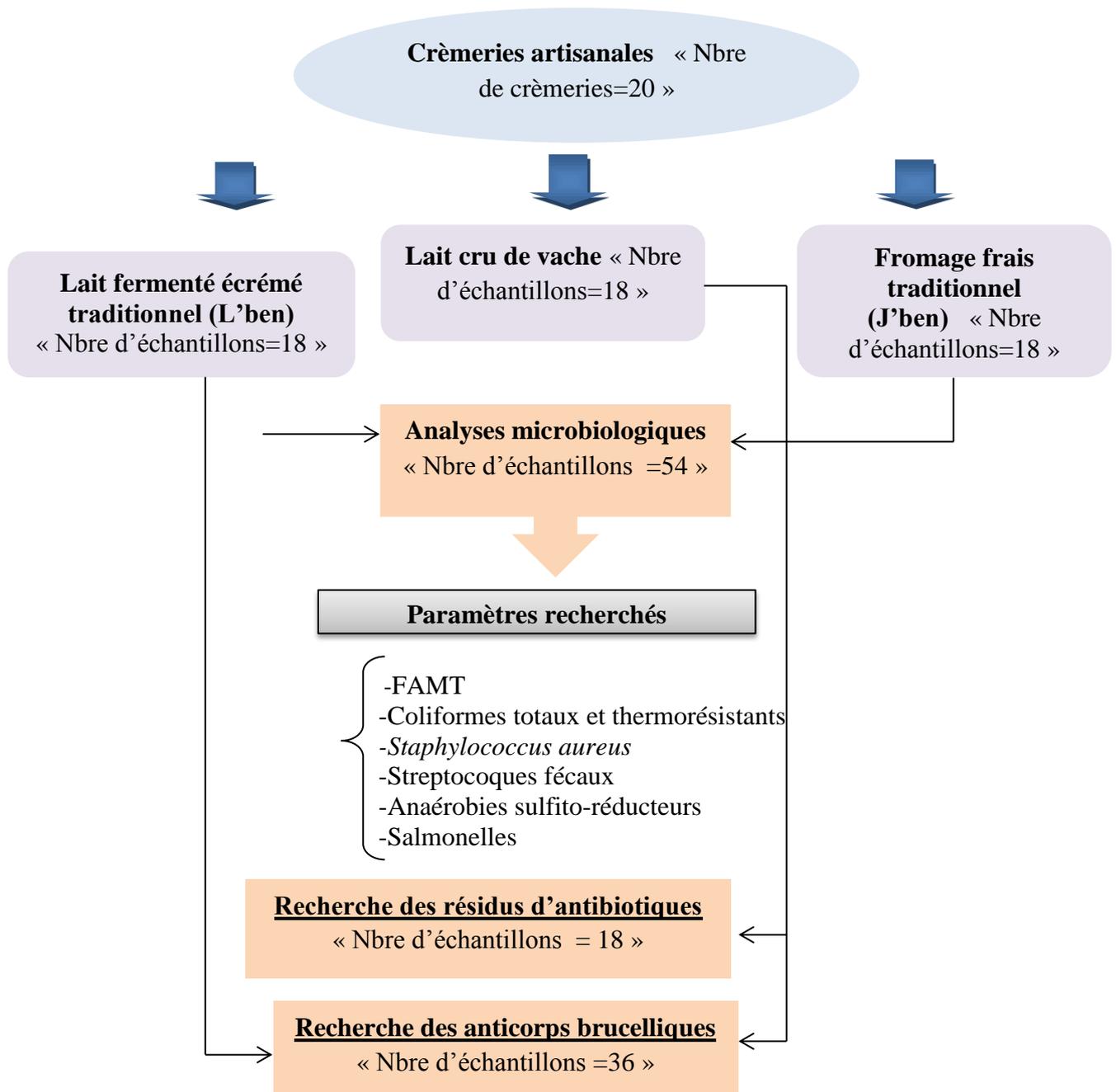


Figure 22: Organisation de l'échantillonnage dans la sous-filière informelle.

4. Répartition des prélèvements

Au cours de la période d'étude s'étalant du Mars 2013 au Mars 2014, 150 prélèvements sont analysés. Les proportions des divers échantillons sont rapportées dans le tableau 20 et la figure 23.

Tableau 20 : Répartition de la nature des prélèvements selon leur origine

Origine des prélèvements	Nature des prélèvements	Nombre des prélèvements	Nombre des prélèvements par strate	%
Strate formelle	Lait cru individuel	48	96	64%
	Lait du chariot trayeur	12		
	Lait de cuve	12		
Strate informelle	Lait de camionnette	12	54	36%
	Lait pasteurisé	12		
	Lait commercialisé	18		
	L'ben	18		
	J'ben	18		
Total			150	100%

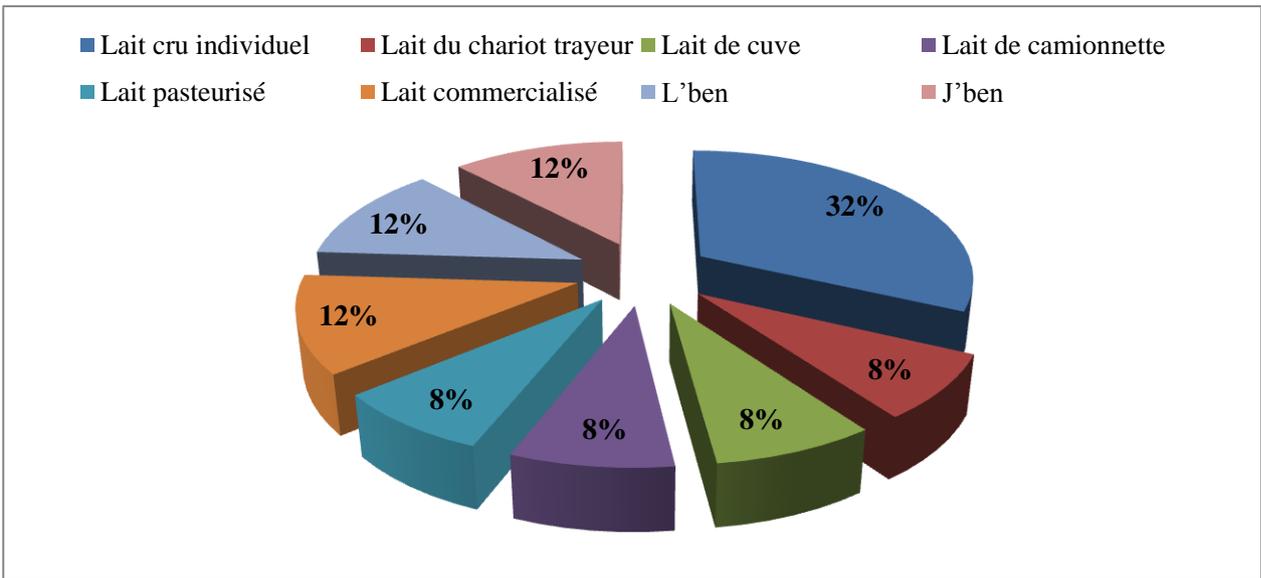


Figure 23 : Répartition des prélèvements.

Ainsi, les différents prélèvements réalisés sont le plus souvent acheminés immédiatement ou à défaut le lendemain matin au Laboratoire Vétérinaire Régional de Laghouat. La température de conservation est comprise généralement entre 4 et 8°C. Le régime de froid est appliqué par l'emploi d'une enceinte isolante à double parois de type « glacière » avec un moyen modéré de réfrigération (de la glace fondante). Le délai entre prélèvement et analyse ne dépassait guère les 24 heures.

5. Mise en évidence des laits anormaux (Californian Mastitis Test)

Le California Mastitis Test (CMT), utilisé depuis plus de 40 ans dans plusieurs pays au monde (RAKOTOZANDRINDRAINNY et al., 2007) cité par (SAIDI et al., 2010), reste le test le plus utile pour le dépistage des inflammations intra mammaires (LARPENT, 1997). Il donne d'une part, une réponse qualitative sur le statut de chaque quartier de la mamelle (saine ou infectée) et d'autre part, permet de sélectionner les animaux sur lesquels seront effectués des prélèvements lors d'enquêtes sur les mammites (SAIDI et al., 2010).

Principe : Ce test permet de déterminer de façon indirecte le nombre de cellules présentes dans le lait et en particulier les cellules épithéliales et leucocytes. Le nombre de ces cellules augmente de façon importante dans le lait mammiteux. Le principe repose sur l'évaluation de la viscosité produite par la libération des acides nucléiques à partir des cellules éclatées sous l'action d'un corps tensioactif. Il s'applique aux laits crus individuels (GUIRAUD, 1998).

Technique : Après élimination des premiers jets, 2 ml de lait sont recueillis dans une coupelle (chaque coupelle correspondant à un quartier) (figures 24a et 24b) et additionnés d'une quantité égale de réactif (figures 24c et 24d). Après agitation durant quelques secondes pour bien mélanger les deux produits (lait et réactif) (figure 24e), la lecture est effectuée sur l'appréciation de l'aspect du mélange (figure 24f). Selon SAIDI et al. (2010), la modification de phase vers la floculation du lait est considérée comme une réaction positive.

Lecture : La relation entre le nombre de cellules et le score du CMT a été établie (tableau 21) pour permettre le dépistage de l'infection du quartier. Ce test est considéré positif à partir d'un score de 2. Si au moins un quartier est positif, la vache est déclarée positive et si tous les quartiers sont négatifs, la vache est déclarée saine (BOUFAIDA et al., 2012).

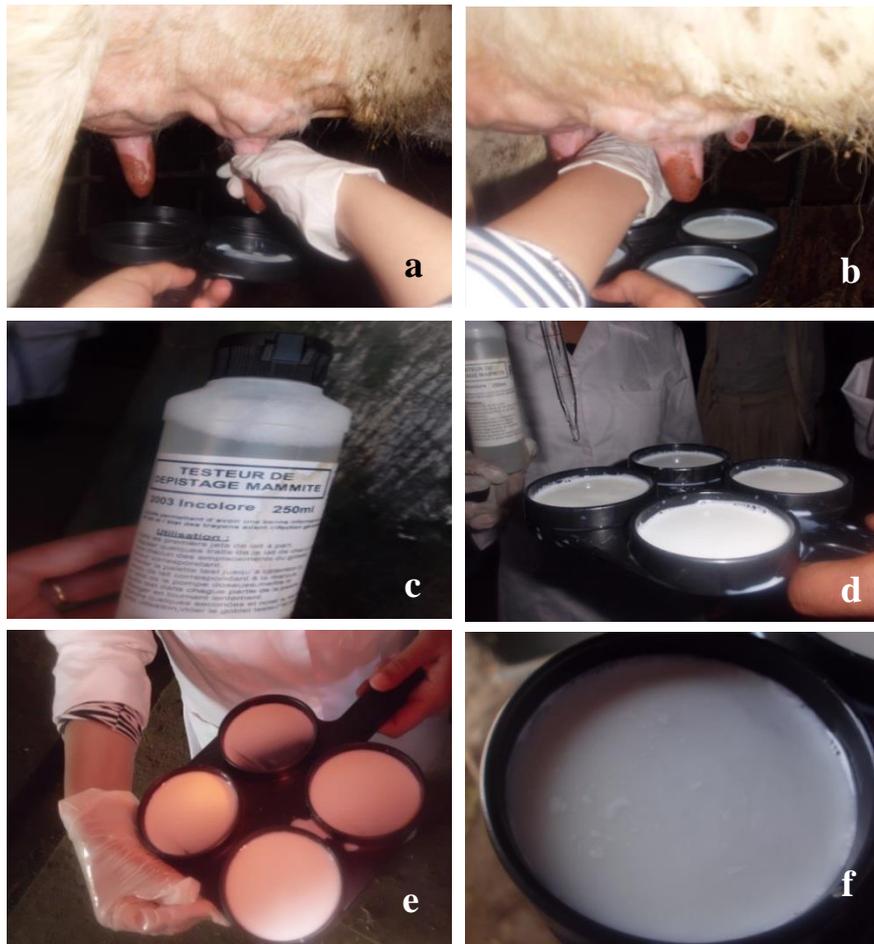


Figure 24: Différentes étapes de la réalisation du test C.M.T.

Tableau 21: Interprétation du California Mastitis Test

Score	Aspect du mélange	Concentration cellulaire (cellules/ml)	Interprétation
0	Mélange liquide sans précipitation	0 à 200 000	Pas d'infection subclinique
1	Floculat très fin qui disparaît après agitation	150 000 à 500 000	Pas d'infection subclinique
2	Floculat très net sans tendance à la gélification	400 000 à 1 500 000	Infection subclinique légère
3	Floculat épais avec formation d'un gel par endroits, consistance du blanc d'oeuf	800 000 à 5 000 000	Infection subclinique nette
4	Gel épais à la consistance du crachat	> 5 000 000	Infection subclinique parfois clinique

Source : BOUFAIDA et al., 2012

6. Analyses microbiologiques au laboratoire

L'analyse microbiologique a consisté essentiellement en une culture bactériologique in-vitro. Elle s'est appuyée sur différentes techniques établies par des organismes de normalisation reconnus mondialement et qui se sont affinées depuis quelques années. Il s'agit essentiellement des normes internationales (ISO, AFNOR) et des normes nationales promulguées au journal officiel (tableau 22).

Tableau 22: Récapitulatif des différentes techniques microbiologiques utilisées

Technique	Normes de référence
Préparation des échantillons pour essai	NF V08-010 (1996) / ISO 6887 Arrêté du 11 Septembre 2004 (JORADP n° 70)
Recherche et dénombrement de la FAMT	NF V 08-011(1991) /ISO 4833 Arrêté du 11 Septembre 2004 (JORADP n° 70)
Recherche et dénombrement des coliformes (totaux et thermorésistants)	NF V 08-015 (1991) /ISO 4832) et NF V08-050 (1992) Arrêté du 11 Septembre 2004 (JORADP n° 70) Arrêté du 24 Mai 2004 (JORADP n° 43)
Recherche et dénombrement des <i>Staphylococcus</i> à coagulase positive	NF V08-014 (1984) /ISO 6888 Arrêté du 11 Septembre 2004 (JORADP n° 70)
Test catalase	NF ISO 7218
Identification des entérobactéries (tests biochimiques classiques)	NF V08-017, NF V08-020 NF V08-052, NF T 90-414
Test oxydase	NF ISO 7218
Recherche des salmonelles	NF V08-013(1993) /ISO 6579 ; NF V08-052 (1997) Arrêté du 23 Janvier 2005 (JORADP n° 42)
Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (NPP)	NF T 90-411 (1989)/ ISO 7899
Recherche et dénombrement des anaérobies <i>sulfito-réducteurs</i>	ISO 7937 (2002)
Recherche des résidus d'antibiotiques	Directive 91/180/CEE (1991)
Détection des anticorps brucelliques	NF V47-005

6.1. Préparation de l'échantillon pour essai

En vue de faciliter l'examen microbiologique et de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume ou de masse, des dilutions sériées devraient être préparées. Elles sont en fonction de la nature du produit et varient entre 10^{-1} et 10^{-5} .

a. Cas des produits liquides (lait et L'ben)

- L'échantillon est agité vigoureusement pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 minutes ;

- 1 ml de l'échantillon pour essai est prélevé à l'aide d'une pipette stérile et rajouté à 9 ml de diluant soit le TSE (Tryptone Sel Eau). Cette dilution primaire est agitée. On obtient alors la dilution 10^{-1} ;

- 1 ml de la dilution primaire est introduit avec une autre pipette stérile dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile. On obtient alors la dilution 10^{-2} ;

- Ces opérations sont répétées avec le diluant stérile en utilisant la dilution 10^{-2} jusqu'à obtention des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} (schéma 8).

b. Cas des produits solides (J'ben)

- 25 g de J'ben sont introduits aseptiquement dans un sachet stérile préalablement taré de type « Stomacher » contenant au préalable 225 ml de diluant;

- Un homogénéisateur de type « Stomacher » est utilisé pour mélanger jusqu'à ce que le produit soit complètement dispersé (1 à 3 minutes). On obtient alors la dilution 10^{-1} (figure 25);

- Les autres dilutions décimales sont préparées de la même façon que celle des produits liquides.

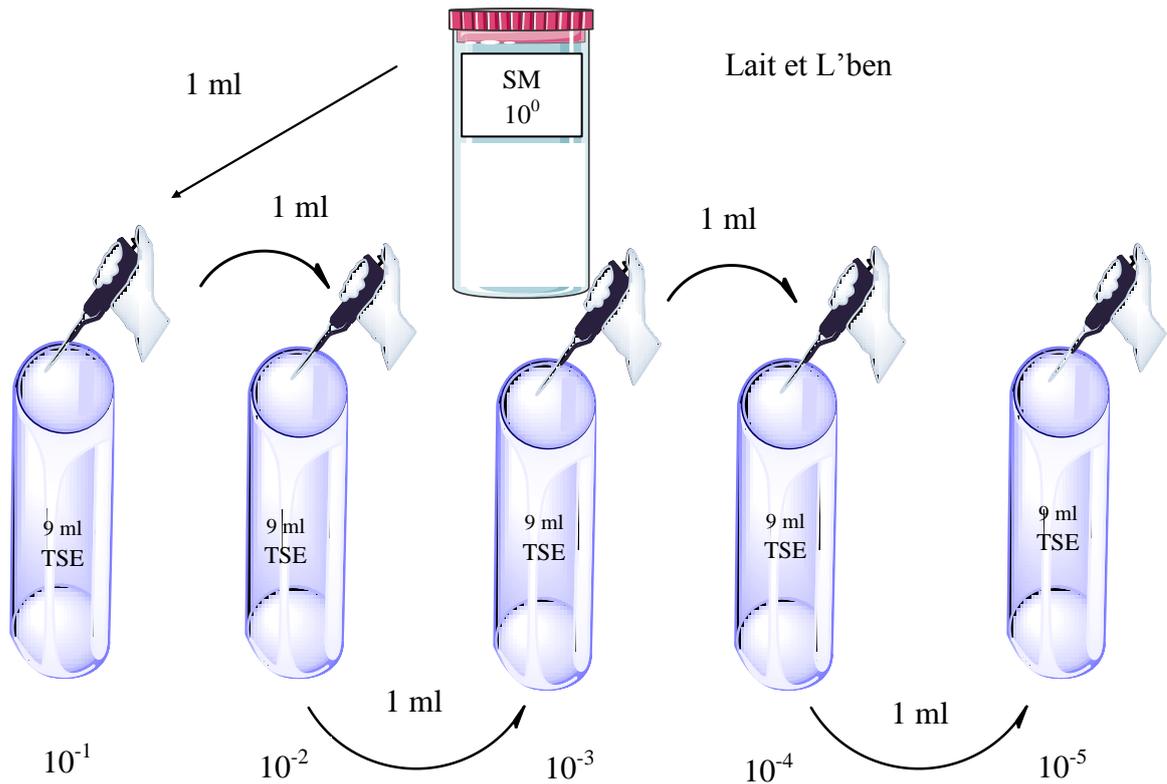


Schéma 8: Préparation des dilutions décimales (Cas des produits liquides).



Figure 25 : Préparation des dilutions décimales (Cas des produits solides).

L'évaluation des différents groupes de flore est réalisée par recherche et/ou dénombrement sur milieux de culture appropriés (tableau 23). Elle porte essentiellement sur le dénombrement de la flore totale, de la flore coliforme, des streptocoques fécaux, de *Staphylococcus aureus*, des anaérobies sulfito-réducteurs et des salmonelles.

Tableau 23 : Récapitulation des différents dénombrements effectués

Types de micro-organismes	Milieux utilisés	Technique d'ensemencement	Conditions d'incubation (Etuve)	Lecture	Tests complémentaires
Flore totale	PCA	1 ml de dilution dans la masse + double couche	72 heures à 30°C	Colonies lenticulaires en masse	Néant.
Coliformes (totaux et thermo-résistants)	VRBL	1 ml de dilution dans la masse + double couche	24 heures à 30°C (C. T); à 44°C (C. th)	Petites colonies rouges en masse	-Isolement sur Hektoen ; -Identification des colonies typiques par tests biochimiques.
<i>S. aureus</i>	Baird Parker + jaune d'œuf + tellurite de potassium	Etalement de 0,1 ml de dilution en surface	24 à 48 heures à 37°C	colonies noires avec liseré blanc et entourées d'un halo	-Isolement sur Chapman ; -Coloration de Gram; -Test catalase; -Test coagulase.
Streptocoques fécaux (du groupe D)	1. Rothe pour présomption et ;	(1 ml de chaque dilution)*3	24 heures à 37°C	Trouble microbien	Confirmation sur Eva
	2. Eva pour confirmation	Repiquage des tubes positifs	24 heures à 37°C	Trouble microbien + pastille violette	Néant.
Anaérobies sulfito-réducteurs	VF + Alun de fer + Sulfite de Sodium	1ml de dilution + 15 ml du milieu	24 à 48 heures à 46°C	Colonies noires en profondeur	Néant .
Salmonelles	1. E.P.T (pré-enrichissement)	25 ml (gr) / 225 ml d'E.P.T	24 heures à 37°C	/	Identification biochimique et antigénique.
	2. R.V (enrichissement)	Repiquage sur R.V	24 heures à 37°C	/	
	3. Hektoen (isolement)	Stries en surface	24 heures à 37°C	colonies gris bleu à centre noir	

PCA : Plate Count Agar ; C.T : Coliformes totaux ; C.Th : Coliformes thermorésistants ; VRBL : Violet Red Bile Lactose agar ; VF : Viande Foie ; E.P.T : Eau Peptonée Tamponnée ; R.V : Rappaport Vassiliadis.

6.2. Recherche et dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT)

Procédure

- 1 ml des dilutions retenues (10^1 à 10^5) est transféré en double dans des boîtes de Pétri stériles;
- 12 à 15 ml de milieu PCA, fondu au préalable et refroidi dans un bain d'eau à $45 \pm 0,5^\circ\text{C}$ sont ensuite coulés (le maintien dans le bain d'eau n'excédait pas trois heures);
- L'inoculum est mélangé soigneusement au milieu en faisant des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de 8. Le délai entre la préparation des dilutions et l'introduction de la gélose dans les boîtes n'excédait pas 15 minutes;
- Les boîtes sont laissées se solidifier sur une surface fraîche et horizontale;
- Environ 4 ml de la gélose nonensemencée sont ajoutés sur la première couche afin de la protéger contre toute contamination puis, laisser solidifier à nouveau.

Incubation

Les boîtes de Pétri sont ensuite placées retournées dans une étuve à $30^\circ\text{C} \pm 1$ pendant 24h, 48h et $72h \pm 2h$ (schéma 9).

Expression des résultats

Il s'agit de compter toutes les colonies lenticulaires ayant poussé en profondeur en tenant compte des facteurs suivants :

- A retenir seulement les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies;
- Seulement deux dilutions successives sont retenues et le nombre de micro-organismes est calculé par millilitre à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre de germes/ml} = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1n_2)d}$$

Où :

- $\sum c$: Somme totale des colonies comptées;
- n_1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution retenue;
- n_2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution retenue;
- d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

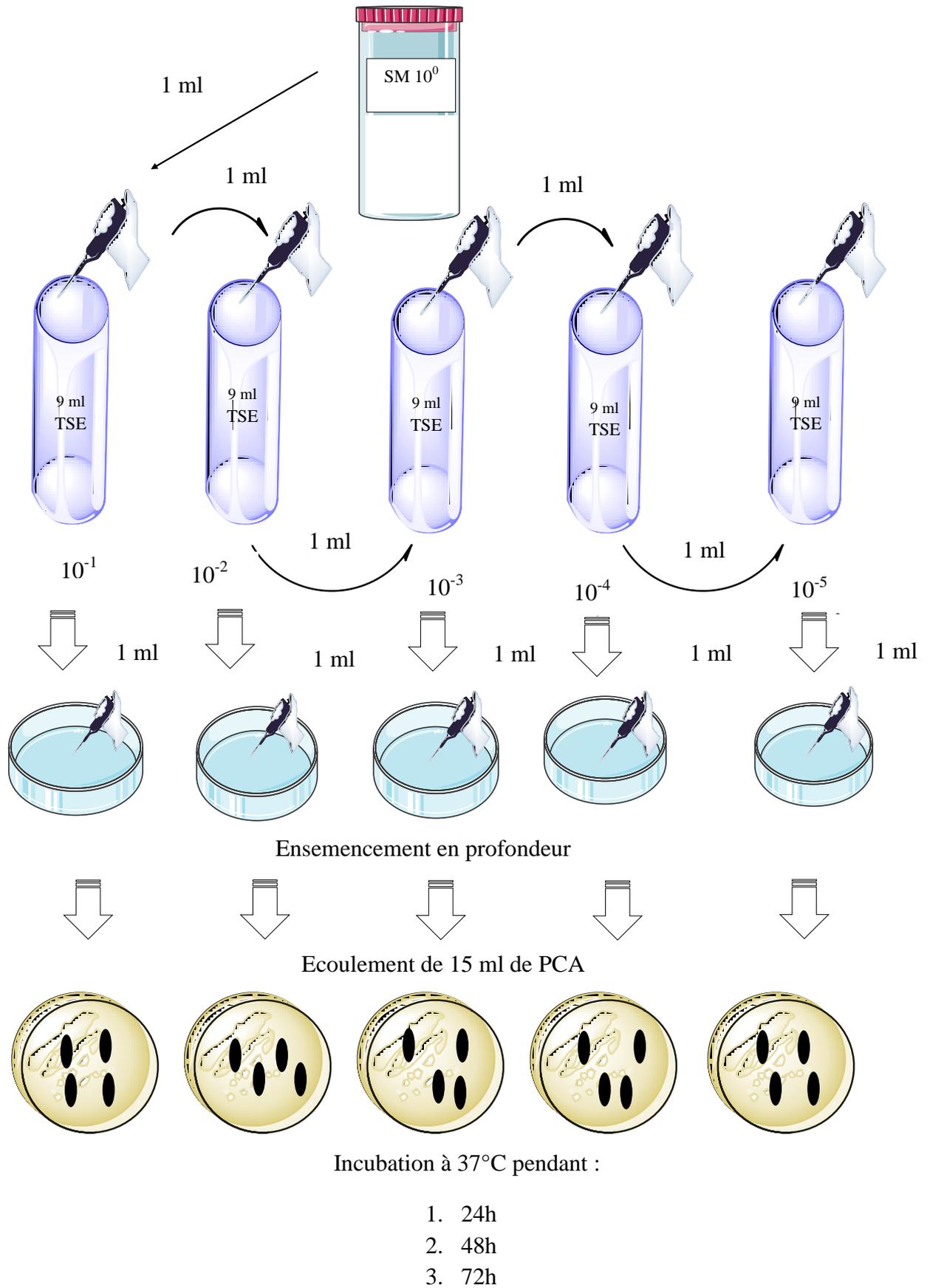


Schéma 9 : Recherche et dénombrement de la FAMT.

6.3. Recherche et dénombrement des coliformes (totaux et thermorésistants)

L'intérêt de cette manipulation est de déterminer pour le produit testé une contamination fécale et d'en apprécier son ampleur car les coliformes sont des bactéries vivant principalement dans les intestins. De plus, les coliformes thermorésistants survivant difficilement hors de l'intestin traduiront donc une contamination fécale récente (JOFFIN, 1999). Leur dénombrement se fait de la même manière que celui de la FAMT.

Procédure

- A partir des dilutions décimales retenues, 1 ml est transféré en double à l'aide d'une pipette dans une boîte de Pétri stérile;
- Environ 15 ml de la gélose VRBL, préalablement fondue et refroidie à $45\pm 1^{\circ}\text{C}$, sont coulés dans chaque boîte;
- L'inoculum est mélangé soigneusement au milieu en faisant des mouvements circulaires de va-et-vient en forme de « 8 »;
- Après solidification, environ 4 ml de la gélose nonensemencée sont ajoutés sur la première couche afin de la protéger contre toute éventuelle contamination puis, laisser solidifier à nouveau (schéma 10).

Incubation

- Une série de boîtes est incubée à 37°C , pendant 24 à 48h et sert à la recherche de coliformes totaux;
- L'autre série est incubée à 44°C pendant 24 à 48 h et sert à la recherche de coliformes thermorésistants.

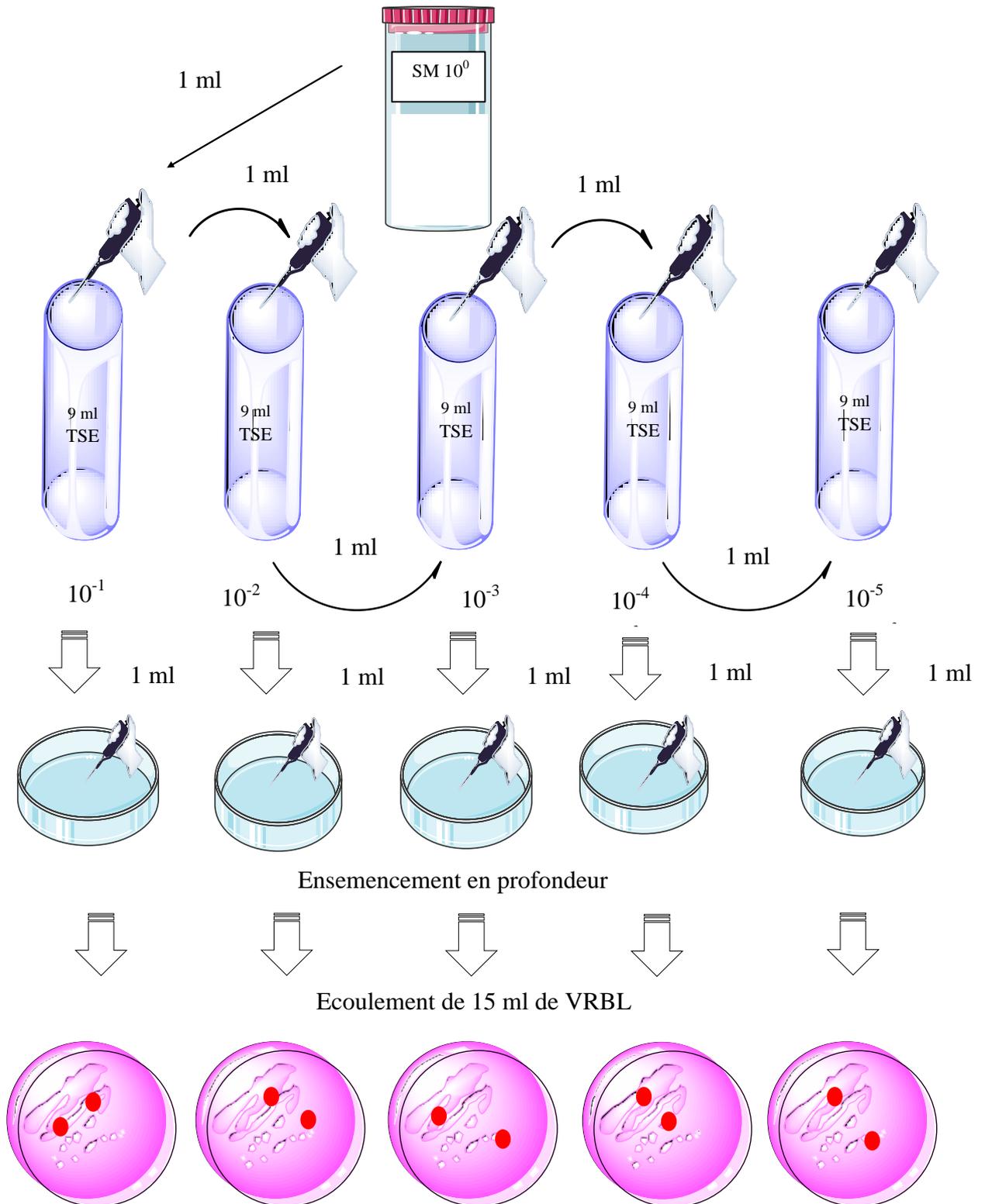
Expression des résultats

Que ce soit à 37 ou 44°C , les premières lectures faites après 24 heures, comptent les colonies rouges en profondeur d'au moins 0.5 mm de diamètre;

La même formule citée précédemment a été utilisée pour comptage.

Isolement et purification

L'isolement des colonies se fait sur milieu Hektoen. Dans le but d'avoir des souches pures, des repiquages successifs sont réalisés sur le même milieu d'isolement.



Première série : 37°C, 24 à 48 h (coliformes totaux);
Deuxième série : 44°C, 24 à 48h (coliformes thermorésistants)

Lecture : petites colonies rouges en masse

Schéma 10 : Recherche et dénombrement des coliformes en milieu solide (VRBL).

6.4. Identification du profil biochimique des souches d'entérobactéries

L'aspect microscopique et macroscopique des colonies ne suffit pas pour identifier de façon précise les bactéries. Il faut rechercher d'autres caractères, principalement les caractères biochimiques ou métaboliques (tableau 24 et annexe III) (GUIRAUD, 1998).

Tableau 24 : Récapitulation de l'ensemble des tests biochimiques

Propriétés	Milieux de culture	Caractères recherchés	Techniques d'ensemencement	Conditions d'incubation	Lecture
Métabolisme des glucides	T.S.I	-Utilisation des sucres ; -Production de gaz et d'H ₂ S	-Piqûre centrale profonde ; -Stries sur la pente	37°C /24h	1. Virage au jaune (sucres+); 2. Fissure (gaz+); 3. Noircissement (H ₂ S+).
	Utilisation d'un disque ONPG	- Détection de la β-D-galactosidase	Suspension bactérienne + disque ONPG	37°C /24h	Virage au jaune (β-D-galactosidase +).
	Clark et Lubs	Caractérisation du type fermentaire	+Rouge de méthyle (RM) + Réactifs VP1, VP2	37°C /48 h 10 à 15 mn	Virage au rouge (RM+) « fermentations acides mixtes ». Virage au rose (VP+) « fermentations butanediolique».
Enzymes respiratoires	Utilisation d'un disque oxydase	-Recherche de l'oxydase	Suspension bactérienne + disque oxydase	30 à 60 secondes	Apparition d'une tache violette (oxydase +).
Métabolisme des peptides	Urée-indole	Dégradation de l'urée	A partir d'une culture sur milieu solide	37°C /24h	Virage au rouge (uréase +).
		Production d'indole	A partir d'une culture sur milieu solide + réactif de kovacs	Quelques secondes	Apparition d'un anneau rouge (indole+).
	Milieux Moller	Recherche des décarboxylases (LDC, ODC et ADH)	Par suspension bactérienne	37°C /24h	Comparaison avec le témoin : virage au violet (décarboxylase +).
Utilisation des substrats énergétiques	Mannitol-mobilité	-Utilisation du mannitol ; -Mobilité	-Piqûre centrale profonde	37°C /24h	-Virage au jaune (mannitol +); -Création d'un trouble (mobilité +).
	Citrate de Simmons	Utilisation du citrate comme seule source de carbone	-Sur la pente	37°C /24h	-Virage au bleu (citrate +).

Sources : DELLARAS, 1998 et GUIRAUD, 2003

6.4.1. Mise en évidence de l'oxydase

Principe : L'oxydase ou Cytochrome oxydase est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes. Sa recherche est utile dans le diagnostic des bacilles à Gram négatif (DELLARS, 1998).

Méthode : Sur une lame porte-objet stérile, un disque oxydase « OX », imprégné d'un réactif : l'oxalate de diméthylparaphénylène diamine imbibé avec une goutte d'eau physiologique stérile (figure 26a), est mis en contact avec une suspension de colonies prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée stérile (figure 26b).

Lecture : La réaction est considérée comme positive si on remarque la présence d'une coloration rose pâle à violet (oxydation du réactif).

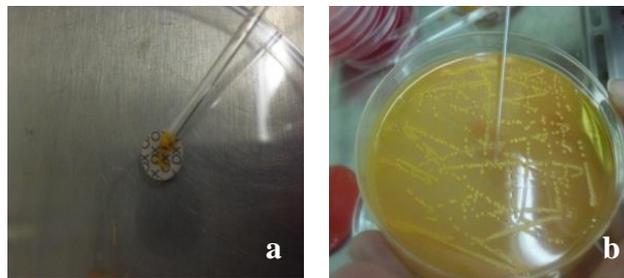


Figure 26 : Test oxydase.

6.4.2. Etude du métabolisme glucidique

a. Caractérisation de la voie d'attaque des glucides

Principe : Cette étude a été réalisée sur un milieu combiné spécifique des entérobactéries T.S.I (Three Sugar Iron). Il s'agit d'un milieu complexe gélosé réparti en tubes à essai sous forme semi-incliné avec pente et culot de 2 cm de haut environ. Il contient du glucose, du lactose, du saccharose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH (le rouge de phénol). Il permet de fournir quatre renseignements principaux : dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation de glucose ; l'acidification de la tranche indique bien l'utilisation du lactose ; l'apparition de bulles dans le culot traduit la production de gaz et un noircissement dû à la formation de sulfure de fer traduit celle de H₂S.

Méthode : L'inoculation du culot se fait par piqûre profonde et la surface inclinée par stries serrées et parallèles pour avoir une culture en nappe avec la souche à tester (figures 27a et 27b). La capsule ne doit pas être serrée à fond. Les tubes sont ensuite étuvés pendant 24 heures à 37°C.

Lecture : La gélose TSI fournit quatre renseignements principaux :

-Fermentation de glucose :

- Culot rouge : glucose non fermenté
- Culot jaune : glucose fermenté

-Fermentation du lactose et/ou du saccharose :

- Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés ;
- Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermentés.

-Production de gaz : apparition de gaz dans le culot (figure 27c et 27d).

-Formation d'H₂S : formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piquère.

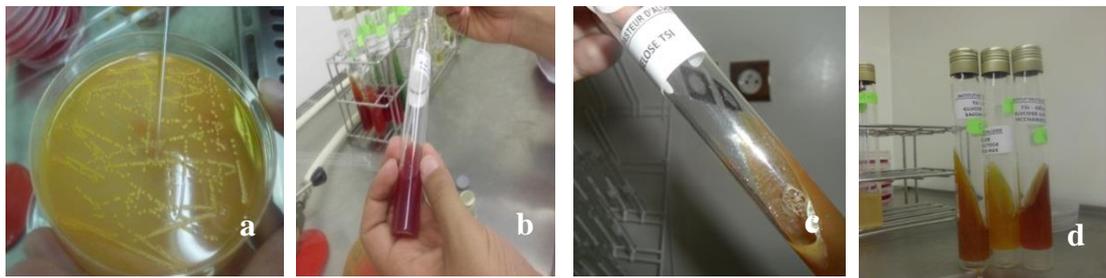


Figure 27 : Test TSI.

b. Recherche de la β -galactosidase (Test ONPG)

Principe : Pour dégrader activement le lactose, les micro-organismes doivent posséder deux enzymes : la perméase et la β -galactosidase. L'épreuve ONPG permet de mettre en évidence la β -galactosidase qui dégrade l'ONPG soit l'orthonitrophényl- β -D-galactopyranoside qui possède une structure analogue au lactose.

Le lactose est formé de deux molécules de glucose et de galactose, tandis que l'ONPG est composé d'une molécule d'orthonitrophényl liée à un galactose. L'hydrolyse de l'ONPG libère l'orthonitrophényle qui est responsable de la coloration jaunâtre du milieu, ce processus se fait selon la réaction illustrée dans la figure 28.

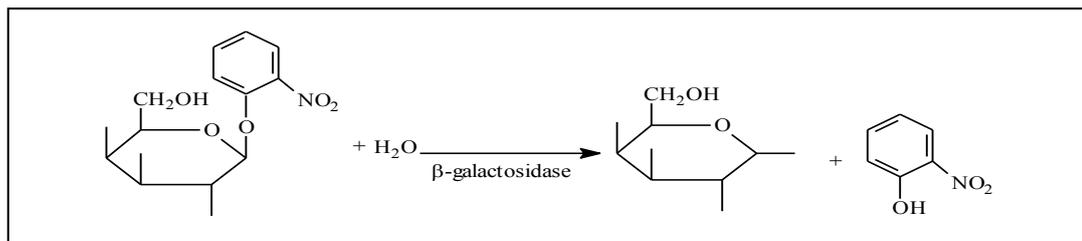


Figure 28 : Hydrolyse de l'ONPG par la β -galactosidase (MARCHAL et BOURDON, 1982).

Méthode : Après avoir préparé une suspension dense d'une culture bactérienne dans un tube à essai stérile contenant 0.5 ml d'eau physiologique (figure 29a), on ajoute un disque ONPG (figures 29b et 29c). L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures. Le test est considéré comme positif lorsque la suspension bactérienne se colore en jaune citron (figure 28d).

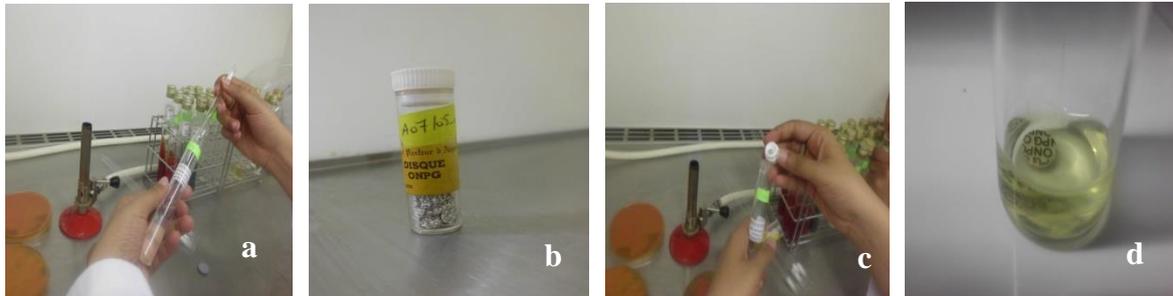


Figure 29: Test ONPG.

c. Détermination du type fermentaire :

Les tests RM et VP permettent l'étude des **produits de fermentation du glucose** : différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique » (GUIRAUD, 2003).

c1. Test RM (Rouge de méthyle)

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose. Il est réalisé en utilisant le milieu Clark et Lubs (bouillon réparti dans des tubes standards)ensemencé par le germe à tester et incubé à 35-37°C pendant 48h. Une à deux gouttes de la solution de rouge de méthyle, sont ensuite ajoutées à 2 ml du milieu d'incubation (figure 30a). La réaction positive se traduit par une teinte rouge, alors que la réaction négative se manifeste par une teinte jaune (figure 30b).

c2. Test VP (au Voges-Proskauer)

Ce test permet la mise en évidence de la **production d'acétoïne** (ou 3-hydroxybutanone) au cours de la fermentation butylène glycolique. Le milieu Clark et Lubs est ensemencé et incubé à 35-37°C pendant 48h. En présence d'**a-naphtol (0.5 ml de VP1)** et d'une **base forte** (soude ou potasse) (1 ml de VP2), l'acétoïne donne une **coloration rouge en milieu très oxygéné (figure 30c)**.

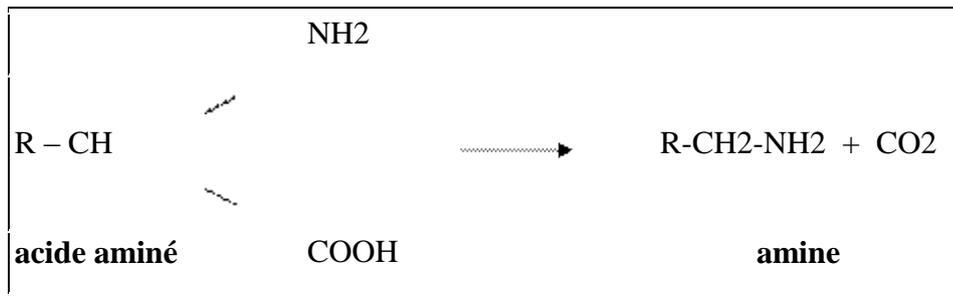


Figure 30 : Tests de RM et de VP.

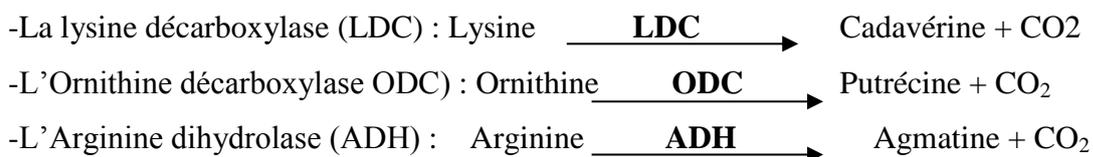
6.4.3. Étude du métabolisme protéique

a. Recherche des décarboxylases (LDC, ODC, ADH)

Principe : Les décarboxylases scindent les acides aminés en entraînant la formation de l'amine correspondante avec la libération de CO_2 suivant la réaction :



Les décarboxylase sont :



Méthode: On réalise une suspension bactérienne par l'eau physiologique stérile, on ensemence les milieux Moller (figure 31a) contenant un acide aminé avec deux gouttes de cette suspension et on recouvre les surfaces avec de l'huile de vaseline (figure 31b). On incube les tubes à 37°C pendant 24h. La lecture se fait par comparaison avec le témoin :

- ♦ la bactérie décarboxylante donne une réaction positive par le virage du milieu vers le violet (figure 31 c), le milieu devient basique (phénomène due à l'alcalinisation);
- ♦ Une bactérie non décarboxylante donne une réaction négative par le passage du milieu au jaune (BENAOUF et al., 1998).



Figure 31: Recherche des décarboxylases.

b. Recherche de l'uréase et production d'indole

Principe : L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée en ions ammonium et carbonate. Le CO_2 et le NH_3 se combinent ensuite pour donner du carbonate d'ammonium. L'indole est le produit de l'hydrolyse du tryptophane par une enzyme, la tryptophanase. Il est mis en évidence grâce à la coloration rouge caractéristique qu'il donne avec le réactif de Kovacs.

Méthode : Le milieu Urée-indole (figure 32a) permet d'étudier simultanément les deux caractères, d'une part, la production d'indole à partir de tryptophane et d'autre part, la production de l'uréase. Ce milieu liquide est réparti en tubes à hémolyse et est ensemencé à partir d'une culture sur milieu solide. Après incubation à 37°C pendant 24 heures l'alcalinisation du milieu qui vire au rouge traduit la présence d'une uréase (figures 32b). Le milieu incubé sert ensuite à la caractérisation de l'indole par le réactif de Kovacs qui se traduit par l'apparition d'un anneau rouge (figures 32c et 32d) (GUIRAUD, 2003).

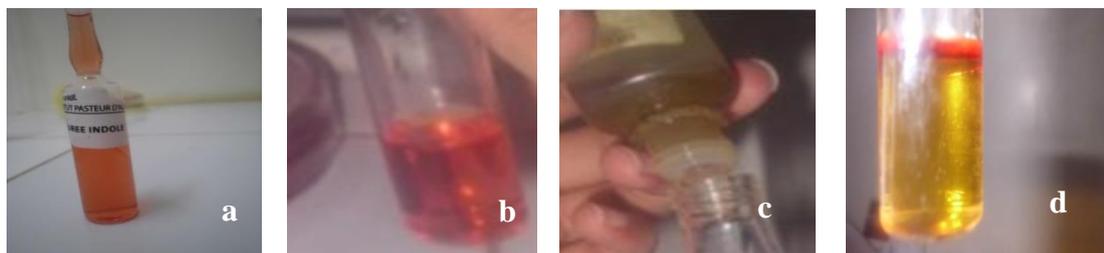


Figure 32 : Test urée-indole.

6.4.4. Utilisation d'autres substrats énergétiques :

a. Test de mannitol mobilité

Principe : Ce test se réalise sur un milieu gélosé semi solide Mannitol-mobilité qui permet d'étudier la mobilité d'une souche bactérienne et de tester sa capacité à dégrader le mannitol (GUIRAUD, 2003).

Méthode : L'ensemencement se fait par une piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur (Figures 33a et 33b). L'incubation se fait à 37°C pendant 24h. Le virage de l'indicateur de pH du rouge au jaune est un indice de la fermentation du mannitol (figure 33c). L'apparition d'un trouble du milieu indique que le germe à étudier est mobile, alors que l'absence de ce trouble est un indice de l'immobilité du germe (GUIRAUD, 2003).

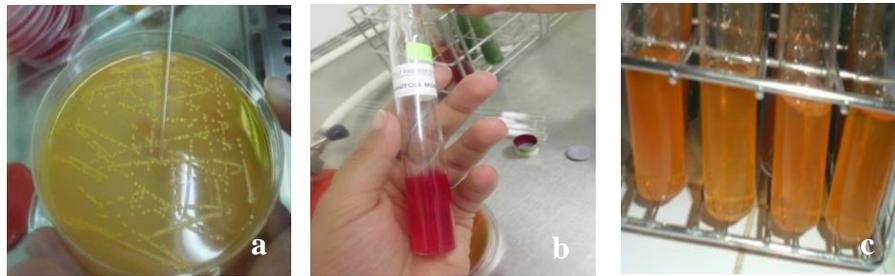


Figure 33: Test mannitol-mobilité.

b. Test de citrate de Simmons :

Principe : Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Seules les bactéries possédant une enzyme citrate perméase seront donc capables d'utiliser le citrate et pourront cultiver sur ce milieu, l'utilisation de citrate provoque l'alcalinisation du milieu.

Méthode : Le milieu Agar Citrate de Simmons est ensemencé et incubé à 36-38 °C pendant 24 h (figures 34a et 34b). Le test positif se traduit par le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu (figure 34c) (DELARRAS, 2007).



Figure 34 : Photographies du test de citrate.

6.5. Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Selon GUIRAUD (1998), la recherche de *Staphylococcus aureus* s'effectue en deux étapes :

- ♦ La recherche se fait sur gélose de Baird Parker ;
- ♦ L'isolement se fait sur milieu gélosé de Chapman.

Procédure

- 5 ml d'une solution de jaune d'œuf au téllurite de potassium à 1% sont ajoutés à la gélose Baird Parker préalablement fondue;

- La gélose Baird Parker fondue et refroidie à 45°C est coulée dans des boîtes de Pétri;

- A l'aide d'une pipette stérile, 0,25 ml de chaque dilution est transféré à la surface d'une plaque de gélose;

- L'inoculum est étalé soigneusement le plus rapidement possible à la surface de la gélose;

- Les boîtes sont incubées couvercle en haut à 37°C pendant 24 ± 2h.

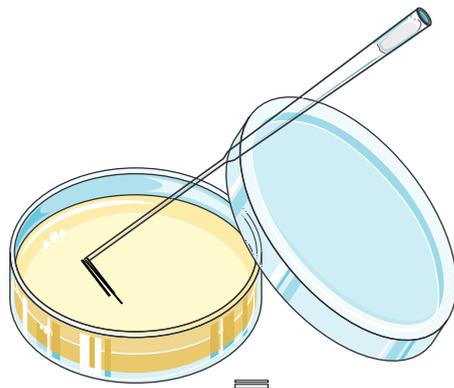
- Après 24h d'incubation, un isolement des colonies noires est effectué à l'aide d'une pipette pasteur;

- L'ensemencement est réalisé sur milieu Chapman coulé en boîtes Pétri;

- L'incubation se fait à 37°C pendant 24h (schéma 11).

Lecture

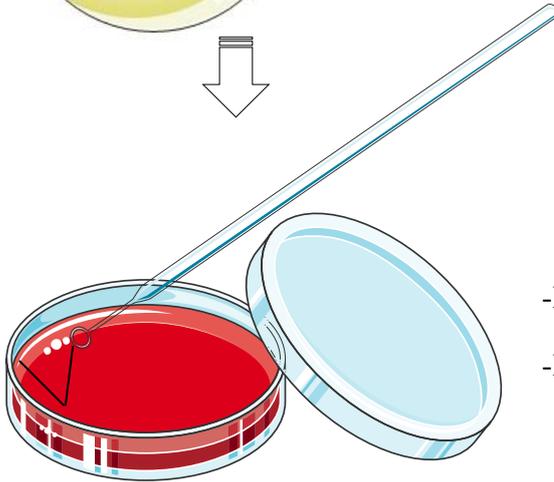
Les colonies caractéristiques sont noires ou grises, brillantes et convexes (1 à 1,5 mm de diamètre après 24h d'incubation et 1,5 à 2,5 mm de diamètre après 48h d'incubation) et entourées d'une auréole d'éclaircissement.



-Etalement de 0,25 ml de chaque dilution sur Baird-Parker

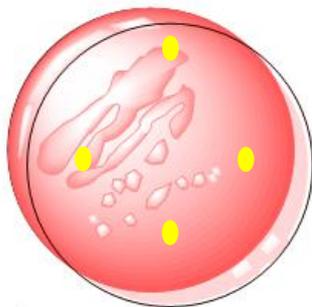


-Sélection des colonies noires entourées d'un halo transparent



-Isolement sur Chapman

-Incubation 37°C / 24 à 48h.



-Colonies lisses, brillantes et pigmentées en jaune.

Schéma 11 : Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*.

Tests de confirmation**a. Coloration de Gram**

Elle permet de classer les bactéries selon leur capacité à fixer le cristal violet. Celles qui possèdent une enveloppe externe sont décolorées lors du lavage à l'éthanol (Gram négatif), alors que celle qui n'en possèdent pas vont retenir la coloration (Gram positif). La technique est décrite en annexe IV.

Lecture

Les Staphylocoques se présentent sous forme de cocci Gram+ groupées en grappes.

b. Recherche de la catalase :

Elle est réalisée selon les étapes suivantes :

- Deux gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes sont placées sur une lame de microscope. Une colonie est ensuite prélevée avec une pipette Pasteur et émulsionnée doucement dans l'une des deux gouttes.

-L'observation se fait immédiatement et après 5 min s'il y a apparition de bulles d'oxygène, la réaction est dite catalase positive. A l'inverse, l'absence de bulles d'air se traduit par une réaction négative (catalase négative).

c. Recherche de la coagulase libre

L'activité coagulase est mesurée à partir d'une culture sur milieu non inhibiteur (bouillon cœur-cervelle) qui est incubé à 30°C pendant 24h (figure 35a).

- 0,1 ml de chaque culture est ajouté stérilement à 0,3 ml de plasma de lapin contenu dans un tube stérile à hémolyse (figures 35b et 35c), et incubé de nouveau à 37°C.

- La coagulation du plasma est examinée après 4 à 6 heures. Une ré-incubation se fait de nouveau à 24 heures.

- La réaction à la coagulase est considérée positive quand le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initialement occupé par le liquide (figure 35d).

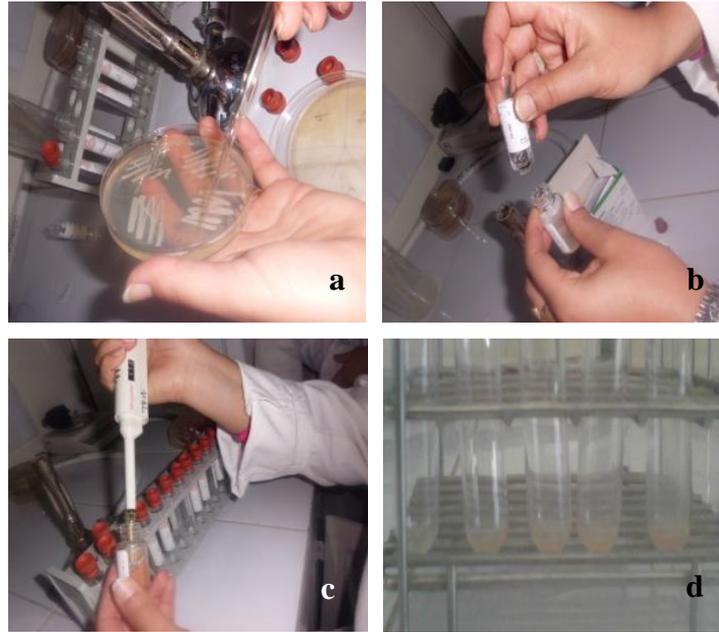


Figure 35: Test coagulase.

Expression des résultats

Pour ces boîtes contenant au maximum 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques pour deux dilutions consécutives, le nombre de Staphylocoques à coagulase positive est compté pour chaque boîte et le nombre **N** de Staphylocoques à coagulase positive identifiés présents dans l'échantillon pour essai est calculé à l'aide de l'équation suivante :

$$N = \frac{\Sigma a}{V \times 1,1 \times F}$$

Où :

Σ a : est la somme des colonies de Staphylocoques à coagulase positive identifiées sur les deux boîtes retenues.

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

V : est le volume étalé sur chaque boîte.

Illustration

Un dénombrement direct d'un produit liquide après ensemencement avec 0,1 ml de produit a donné les résultats suivants :

- à la première dilution retenue (10^{-2}) : 56 colonies caractéristiques,
- à la deuxième dilution retenue (10^{-3}) : 3 colonies caractéristiques.

On a repiqué :

- Parmi les 56 colonies, trois colonies dont deux se sont révélées à coagulase positive d'où : **a = 37**,
- Parmi les trois colonies, les trois se sont révélées être toutes à coagulase positive, d'où : **a = 3**.

$$37 + 3$$

$$N = \text{-----} = 36\ 364$$

$$0,11 \times 10^{-2}$$

Le résultat est de : **$3,6 \times 10^4$** .

6.6. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux en milieu liquide :

Les streptocoques fécaux sont des streptocoques des matières fécales. Ils appartiennent essentiellement au genre *Enterococcus*. Leur antigène de paroi les classe dans le groupe D de Lancefield. Toutefois, des *Streptococcus* possèdent le même antigène, comme *Streptococcus bovis*, *Str. suis*, *Str. equinis*, sont aussi des hôtes normaux de l'intestin que l'on ne pourra distinguer des *Enterococcus* que par la culture en milieu hypersalé (65g/ml) (JOFFIN, 1999).

❖ Test de présomption :

- On prépare dans un portoir une série de tubes contenant le milieu sélectif de Rothe à raison de trois tubes par dilution ;

- A partir des dilutions décimales 10^{-3} à 10^{-1} , on porte aseptiquement 1 ml dans chacun des trois tubes correspondant à une dilution donnée ;

- On mélange bien le milieu et l'inoculum.

Incubation : se fait à 37°C pendant 24 à 48 h.

Lecture : sont considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

❖ **Test de confirmation ou test de Mac-Kenzie:** Chaque tube de Rothe trouvé positif lors du test de présomption fait l'objet d'un repiquage à l'aide d'une anse bouclée dans un tube de milieu Eva-Lytski. Bien mélanger le milieu et l'inoculum.

Incubation : l'incubation se fait à 37 °C pendant 24 heures.

Lecture : sont considérés comme positifs, seuls les tubes présentant à la fois :

- un trouble microbien;
- une pastille violette au fond du tube.

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady (Annexe V) en tenant compte uniquement des tubes d'Eva positifs ou négatifs (schéma 12).

Illustration :

Si, sur milieu de Rothe à la dilution:

- * 10^{-1} : 2 tubes sur 3 sont positifs, donc à repiquer,
- * 10^{-2} : 2 tubes sur 3 sont positifs, donc à repiquer,
- * 10^{-3} : 1 tube sur 3 est positif, donc à repiquer.

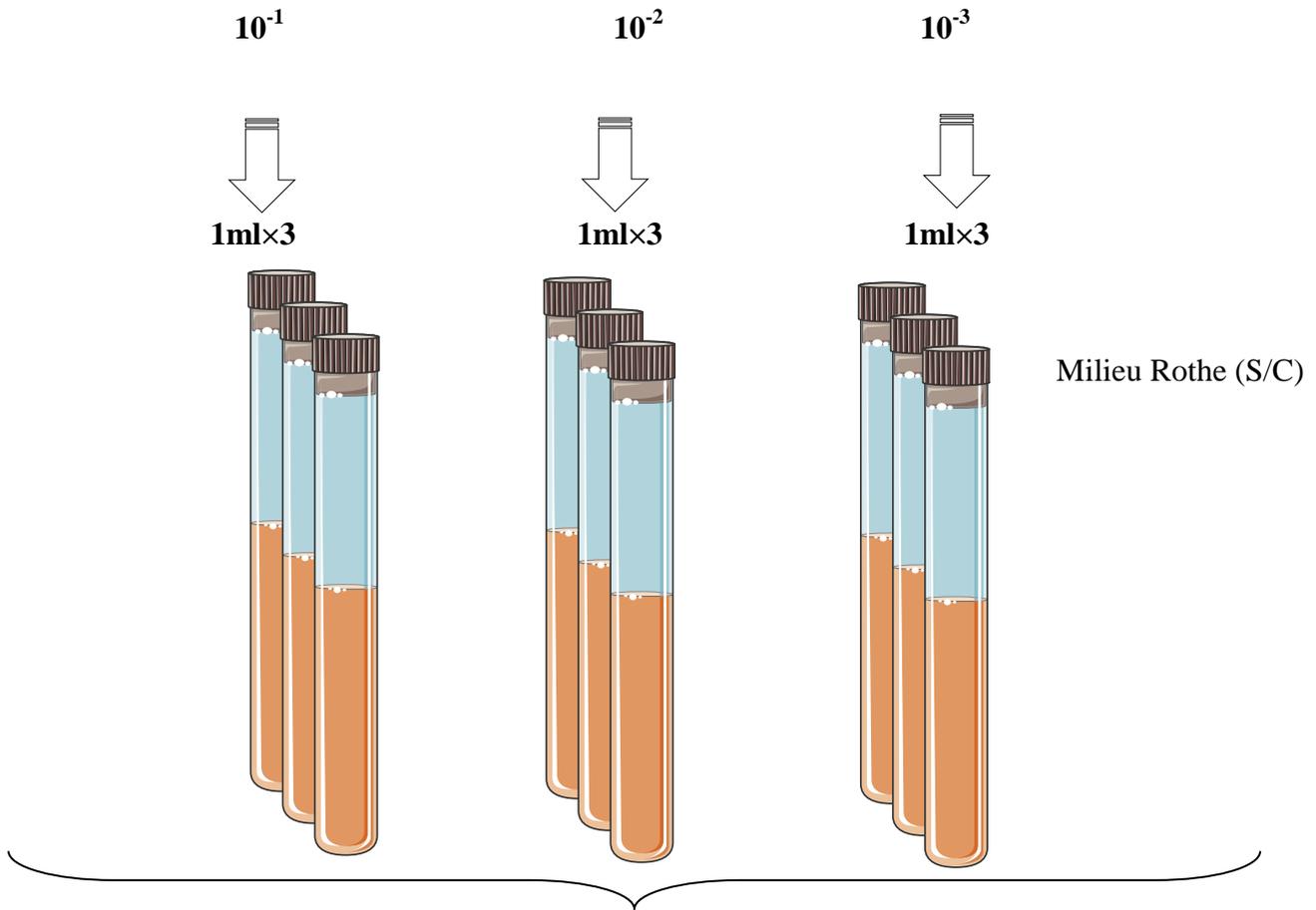
Cela signifie, qu'on a 5 tubes à repiquer sur milieu EVA.

Après repiquage et incubation, si à la dilution:

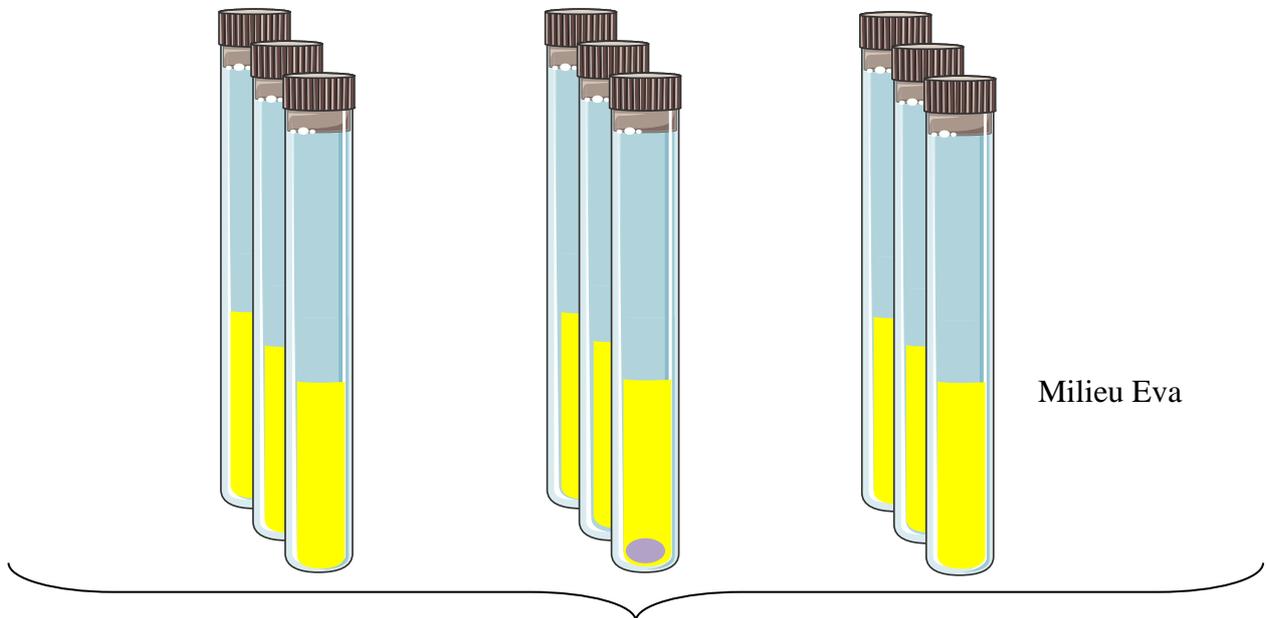
- * 10^{-1} : 1 tube sur 2 est positif,
- * 10^{-2} : les 2 tubes sont négatifs,
- * 10^{-3} : le tube repiqué est positif,

Le nombre caractéristique sera de «101», ce qui correspond à 0,7 sur la table de Mac Grady. Donc, considère qu'il y a 0,7 Streptocoques fécaux à la dilution 10^{-1} . Mais tenant compte du facteur de dilution et pour revenir à 1, il faut multiplier ce nombre par l'inverse de la première dilution soit : $0,7 \times 10 = 7$ germes /ml.

Le résultat final sera donc de 7 Streptocoques fécaux par gramme ou ml de produit à analyser.



Test de présomption : Incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures



Test de confirmation ou test de Mac Kenzie : Incubation à 37°C pendant 24 heures.

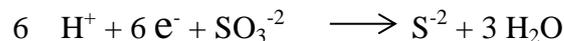
Lecture : Pastille violette + trouble microbien

Lecture finale : Table de Mac Kenzie

Schéma 12 : Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux.

6.7. Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs

Ces germes sont des anaérobies stricts. Ils ont la capacité de réduire les sulfites en sulfures selon la réaction:

**Procédure**

-Au moment de l'emploi, un flacon de gélose Viande-Foie est fondu et refroidi dans un bain d'eau à 45°C. Une ampoule d'Alun de Fer et une ampoule de sulfite de sodium sont ajoutées et mélangées soigneusement au milieu;

- De chaque échantillon de lait cru, 1 ml est prélevé aseptiquement dans un tube stérile;

- Les tubes sont ensuite introduits dans un bain d'eau pendant quelques minutes (10 min) à 80°C;

- Après, un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet est réalisé dans le but d'éliminer les formes végétatives et de garder uniquement les formes sporulées;

- Environ 7.5 ml de gélose Viande Foie prête à l'emploi, sont ajoutés dans chaque tube. Le tube est laissé se solidifier sur paillasse pendant 30 minutes;

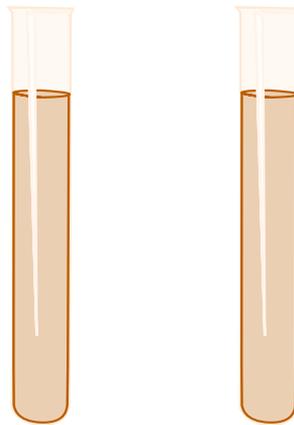
- Ces tubes sont ainsi incubés à 46°C pendant 24 à 48h.

Lecture

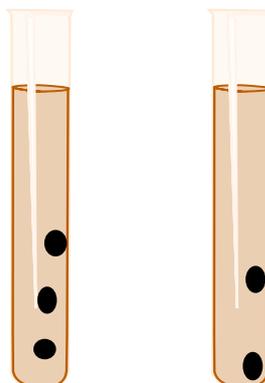
Seuls les tubes contenant des colonies colorées en noire et d'un diamètre supérieur à 0.5 mm sont considérés comme positifs (schéma 13).



1 ml de l'échantillon au bain Marie (80°C pendant 10 min) suivi d'un refroidissement immédiat sous l'eau de robinet



Incubation : 46°C pendant 24 à 48h



Lecture : Colonies noires

Schéma 13 : Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs.

6.8. Recherche des Salmonelles

La recherche des salmonelles nécessite la succession de 3 étapes :

- Pré-enrichissement**: se fait par le diluant EPT;
- Enrichissement** : dans un milieu sélectif Rappaport Vassiliadis;
- Isolement** : sur gélose Hektoen;
- Identification biochimique et antigénique.

Pré enrichissement

- 25 g de J'ben sont prélevés dans 1 sachet stérile de type Stomatcher contenant 225 ml de TSE ;

- Après homogénéisation, le mélange est incubé à 37°C pendant 24h.

Enrichissement

- 0.1ml de solution mère, (dans le cas des produits liquides) et 1ml du milieu de pré-enrichissement (dans le cas du produit solide « J'ben »), est introduit dans un tube de Rappaport Vassiliadis et incubé à 44°C pendant 24h.

Isolement

-A l'aide d'une anse de platine, 0,1 ml de la solution enrichie est étalée à la surface de la boîte de Pétri contenant le milieu Hektoen préalablement coulé;

- Les boîtes sontensemencées et incubées à 37°C pendant 24h (schéma 14).

Lecture

Les salmonelles apparaissent sous forme de petites colonies de couleur gris bleu à centre noir.

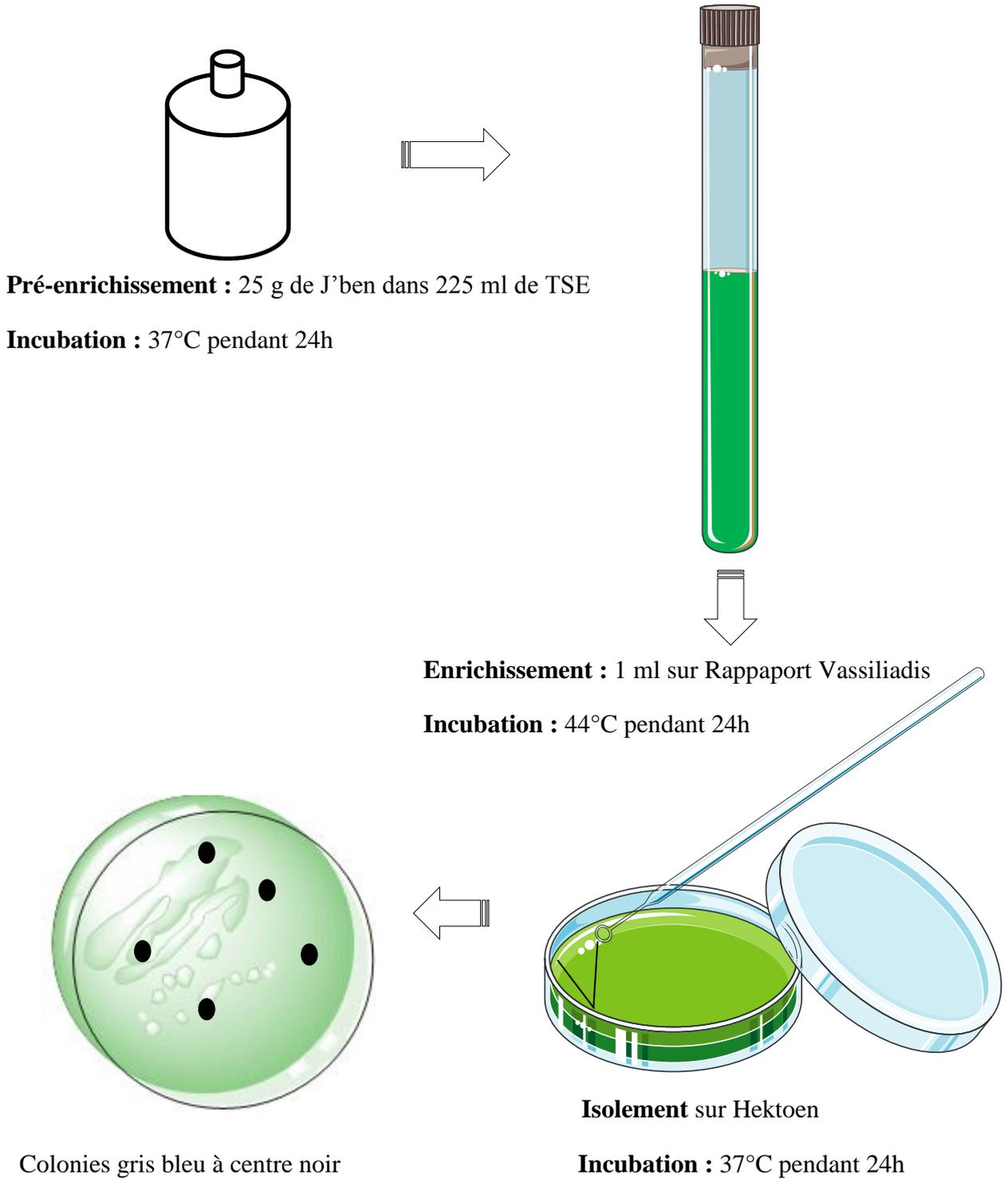


Schéma 14 : Recherche des Salmonelles.

Identification biochimique

Cinq colonies caractéristiques et suspectes font l'objet d'une identification biochimique (tableau 25)

Identification antigénique

Cette dernière repose sur l'agglutination sur lame de verre, à partir des mêmes colonies isolées la veille sur gélose nutritive, à l'aide des sérums de groupes OMA et OMB.

Tableau 25 : Récapitulatif des principaux caractères biochimiques des Salmonelles

Essais de confirmation	Réaction positive ou négative	Pourcentage de souches de salmonella présentant la réaction
Glucose TSI (Formation d'acide)	+	100
Glucose TSI (Formation de gaz)	+	91.9
Lactose TSI	-	99.2
Saccharose TSI	-	99.5
Sulfure d'hydrogène TSI	+	91.6
Décomposition de l'urée	-	100
Décarboxylation à la lysine	+	94.6
Réaction de la β -galactosidase	-	98.5
Réaction de Voges-Proskauer	-	100
Réaction de l'indole	-	98,9

Source : Arrêté du 23 Janvier, 2005

7. Détection des résidus d'antibiotiques par la méthode classique

La présence de résidus d'antibiotiques, outre les risques directs ou indirects qu'ils présentent pour le consommateur, peut se révéler un véritable fléau pour l'industrie de transformation du lait en produits laitiers (BEN-MEHDI, 2009).

Méthode

La recherche de résidus d'antibiotiques a été effectuée selon la méthode officielle européenne de détection des résidus d'antibiotiques dans le lait (Décision de la commission 91/180/CEE du 14 février 1991) appliquée dans la communauté européenne depuis le 1er janvier 2002. Deux techniques ont été successivement mises en œuvre : Un test d'acidification qui repose sur la mise en évidence d'une éventuelle inhibition de *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* (souche C953, CIP 5281), indiquée par le virage d'un indicateur coloré (pourpre de bromocrésol) par les résidus d'antibiotiques qui seraient présents dans l'échantillon. Suivi par l'épreuve de confirmation correspondant à la réalisation de deux tests de diffusion en gélose l'un avec *Bacillus subtilis* ATCC 6633 à 30°C et l'autre avec *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* à 55°C.

7.1. Test d'acidification

Ce test nécessiterait la préparation de trois solutions à savoir un mélange nutritif, une solution de triméthoprime et une solution de pénicilline G (annexe VI).

Procédure

0.1 ml de l'échantillon de lait, préalablement chauffé à 80°C au bain Marie et refroidi (figure 36a), estensemencé par de spores de *B. stearothermophilus* dans un milieu gélosé Muller-Hinton (MH), comprenant 50 µl du mélange nutritif et 0.1 ml de la solution de triméthoprime (figure 36b). Un témoin négatif (lait en poudre reconstitué) et un témoin positif (solution de pénicilline G) sont mis à incuber dans les mêmes conditions (55°C pendant au moins 4 heures) en même temps que les échantillons à tester (figure 36c).

Interprétation des résultats

- La persistance de coloration pourpre des ampoules qui contiennent la solution étalon de pénicilline ou l'échantillon de lait révèle la présence d'antibiotiques (figure 36d);
- Une coloration irrégulière des ampoules contenant l'échantillon de lait révèle la présence de substances inhibitrices entre les niveaux visés;

- Une coloration jaune des ampoules contenant le lait témoin exempt de substances inhibitrices ou l'échantillon de lait révèle l'absence de substances inhibitrices de l'organisme test.



Figure 36: Différentes étapes de la réalisation de l'épreuve d'acidification.

7.2. Test de confirmation (diffusion en gélose)

Le milieu gélosé Muller-Hinton préalablement fondu à 100°C et refroidi à 55°C est ensemencé avec des spores de *B. subtilis* et de *B. stearothermophilus* à raison de 10^3 et 10^5 spores/ml, puis coulés dans des boîtes de Pétri. Les disques de papier filtre stériles, imprégnés du lait à tester par capillarité sont ensuite déposés à la surface de la gélose (figures 37a et 37b). Les boîtes Pétri sont ainsi mises à incuber à 55°C pour *B. stearothermophilus* et 30°C pour *B. subtilis*.

Interprétation des résultats

Après 24h d'incubation (figure 37c), les diamètres des zones d'inhibitions sont mesurés par le biais d'un pied à coulisse. La présence d'inhibiteurs se manifeste par la présence d'une zone translucide d'au moins 2mm de diamètre (figure 37d).

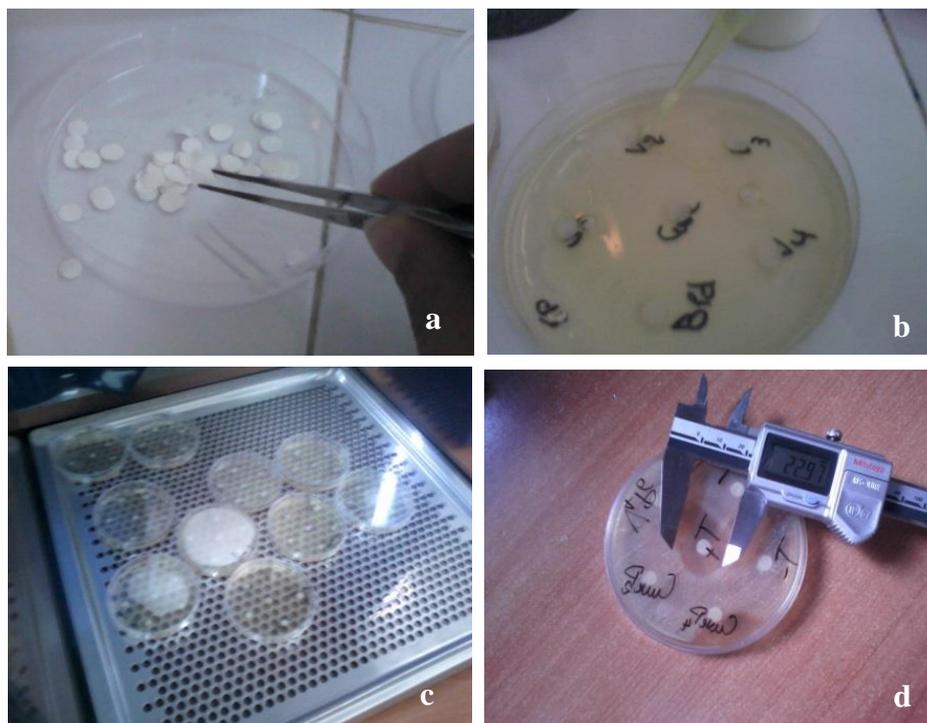


Figure 37 : Différentes étapes de la réalisation de de l'épreuve de confirmation.

Les différentes familles d'antibiotiques ciblées par l'emploi de ces trois souches de références sont illustrées dans l'annexe VII.

8. Détection des anticorps brucelliques (Ring-Test)

La méthode de l'anneau ou Ring-Test permet la mise en évidence des anticorps brucelliques dans le lait. C'est une technique très simple à mettre en œuvre particulièrement bien adaptée à la surveillance épidémiologique de cheptels laitiers.

Principe

Elle utilise une réaction d'agglutination entre les anticorps contenus dans le lait et les bactéries colorées de l'antigène : *Brucella abortus* (biovar 1, souche 99, inactivée et colorée à l'hématoxyline). Lorsque les corps bactériens colorés sont mis en présence de lait contenant des anticorps spécifiques, il se forme des complexes antigènes-anticorps qui sont progressivement entraînés par la matière grasse à la surface du lait et forment un anneau bleu-violet.

Procédure

- L'antigène est placé une heure à température ambiante (18-23°C) et est agité soigneusement avant le début des tests (figure 38a);

- Les échantillons à tester sont homogénéisés puis répartis en tubes de 1 ml;
- Pour l'analyse de lait de mélange, l'épreuve est effectuée avec le lait non dilué;
- Pour l'analyse de lait individuel, l'épreuve est effectuée avec le lait dilué de 1/1 à 1/16 dans un lait négatif (lait UHT) (figure 38b);
- 50µl d'antigène sont ensuite ajoutés (figure 38c);
- L'incubation se fait pendant 1h à l'étuve à 37 ± 2 °C puis 18 à 20 h entre 2-8°C (figure 38d);
- Afin de standardiser la lecture, un témoin est introduit lors de chaque série d'analyses, un lait positif ainsi qu'un lait connu négatif.

Expression des résultats

- Un lait individuel est considéré comme positif à partir de la dilution au 1/8;
- Anneau de crème moins coloré que le lait sous-jacent : lait négatif;
- Anneau de crème plus ou aussi coloré que le lait sous-jacent : lait positif.

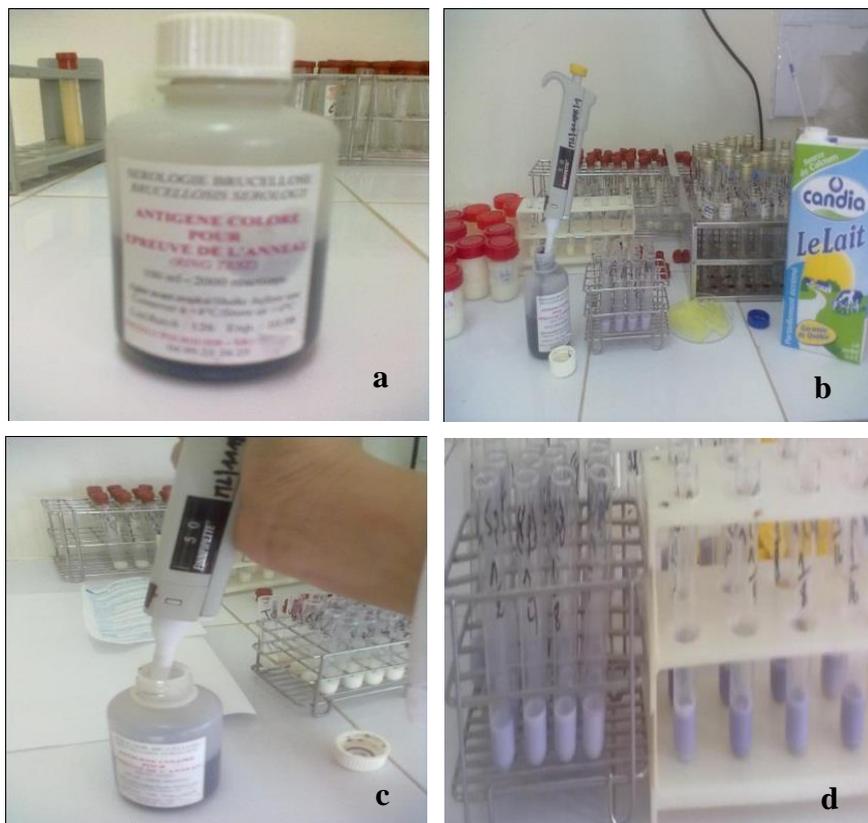


Figure 38 : Détection des anticorps brucelliques par la méthode du Ring-Test.

9. Détermination de l'antibiorésistance des souches bactériennes isolées

L'antibiogramme est effectué selon la méthode classique de diffusion de l'antibiotique sur gélose à partir de disques d'antibiotiques selon les recommandations des différents fascicules de la standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale (éditions 2005, 2008 et 2011), établis par le Ministère de l'Agriculture et celui de la Santé, de la Population et de la Réforme Hospitalière.

Au total, 50 souches sont ainsi sélectionnées et étudiées pour leur sensibilité vis-à-vis des antibiotiques, dont 34 correspondent aux *S. aureus* contre 16 souches d'*E. coli*. Pour les premières souches, vingt-quatre molécules d'antibiotiques, de marque « Bio-Rad », utilisées aussi bien en médecine vétérinaire que humaine et connues pour être actives sur cette bactérie sont testées. Quant aux secondes, à savoir *E. coli*, l'antibiorésistance des souches est déterminée à l'encontre de vingt molécules d'antibiotiques.

9.1. Mode opératoire

La technique de l'antibiogramme réalisée est celle des bactéries non exigeantes.

Inoculation

- Après revivification des souches (figure 39a) et à partir d'une culture pure obtenue après 18h d'incubation sur milieu d'isolement, quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont raclées à l'aide d'une anse de platine;
- L'anse est déchargée dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%;
- La suspension bactérienne est ensuite homogénéisée, son opacité est équivalente à 0,5 Mac-Farland sur un densitomètre de marque « DEN-1 ». L'inoculum est ajusté en ajoutant, soit de la culture s'il est trop faible ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.
- L'ensemencement se fait dans les 15min qui suivent la préparation de l'inoculum.

Ensemencement (écouvillonnage)

- Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne (figure 39b);
- Un essorage est réalisé en pressant l'écouvillon fermement sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum;

- L'écouvillon est ensuite frotté sur la totalité de la surface gélosée sèche, de haut en bas en stries serrées (figure 39c);
- L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. L'ensemencement se termine en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose. Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, l'écouvillon est rechargé à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques

- Au maximum, 6 disques d'antibiotiques sont mis sur une boîte de 90mm de diamètre. Ils sont espacés de 24mm centre à centre;
- Chaque disque d'antibiotique est pressé à l'aide d'une pince pour s'assurer de son application. Une fois le disque est appliqué, celui-ci ne doit pas être déplacé (figures 39d, 39e et 39f);
- L'incubation se fait à 35°C pendant 18h (figure 39g).

Lecture

L'estimation de l'antibiorésistance des souches est basée sur la mesure avec précision des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse (figure 39h), à l'extérieur de la boîte fermée. Ainsi, les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans les tables de lecture de l'annexe VIII et selon le comportement des souches vis-à-vis des molécules d'antibiotiques, ces dernières sont classées dans l'une des catégories : Sensible Intermédiaire ou Résistante.

9.2. Contrôle de qualité

Ce test a pour objectif d'assurer la :

- précision et la fiabilité de la technique des tests de sensibilité;
 - performance des réactifs utilisés dans les tests;
 - qualité du personnel qui effectue les tests et la lecture.
- Aussi, afin de se conformer à ces exigences, des souches de référence sont ainsi utilisées :
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
 - *Escherichia coli* ATCC 25922.

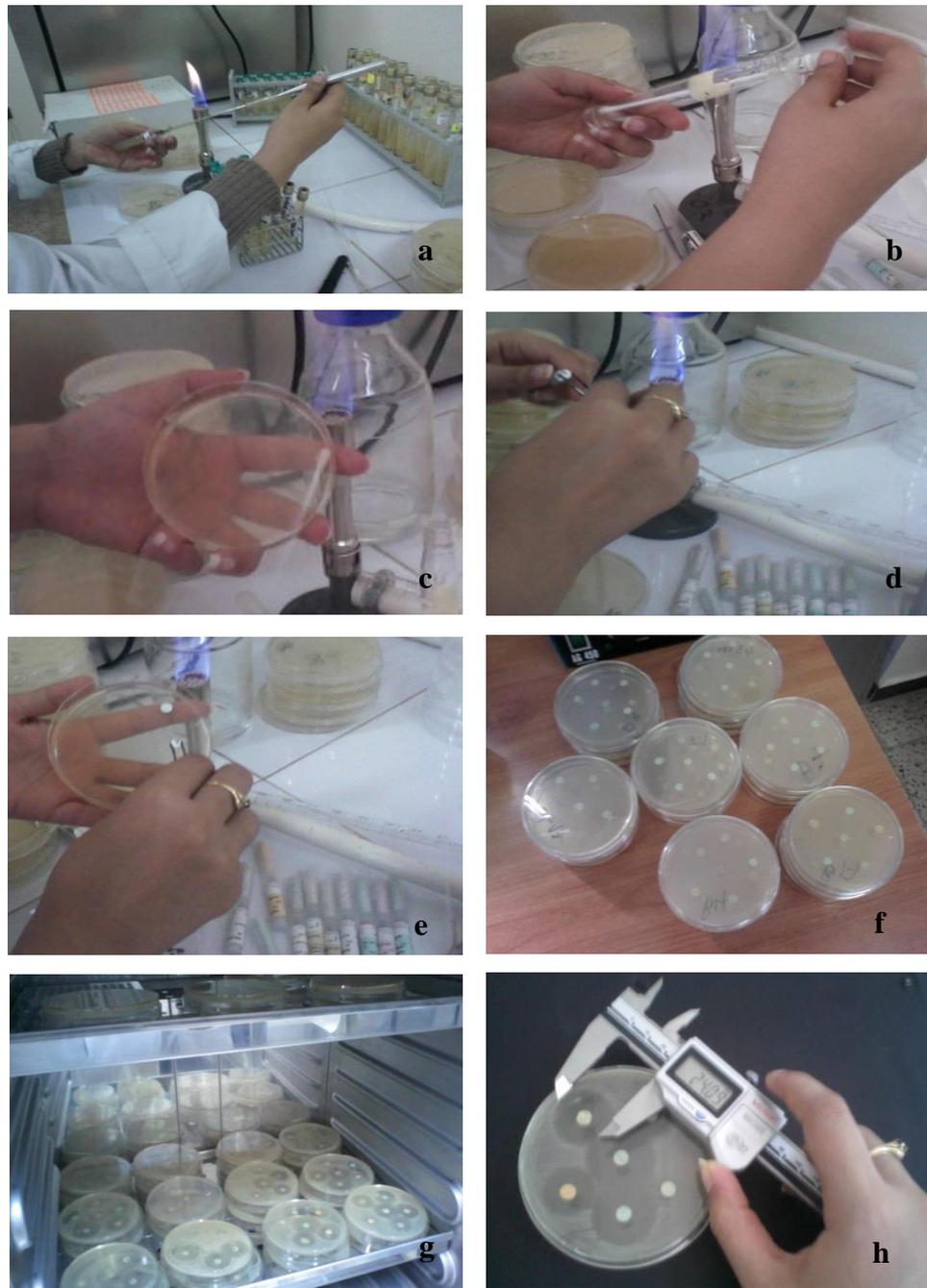


Figure 39: Visualisation des différentes étapes de la réalisation de l'antibiogramme.

Les différentes molécules d'antibiotiques utilisées dans cette étude sont classées selon leurs familles et leurs charges respectives (tableau 26).

Tableau 26 : Différentes molécules d'antibiotiques testées

Familles d'antibiotiques	Pour <i>S. aureus</i>	Pour <i>E. coli</i>
β-lactamines	Pénicilline (PEN) 10 UI	Ampicilline (AM) 10 µg
	Oxacilline (OX) 1 µg	Ceftiofur (XNL) 30µg
	Amoxicilline (AX) 10 µg	
	Amoxicilline + acide clavulanique (AMC) 20/10µg	
	Céfoxitine (FOX) 30µg	Aztreonam (ATM) 30 µg
	Céphalothine (CF) 30 µg	
	Cefalexine (CN) 30 µg	/
	Céfotaxime (CTX) 30 µg	
	Néomycine (N) 30 µg	
	Aminosides	Gentamicine (GM) 10 µg
Streptomycine (S) 10 µg		
Kanamycine (K) 30 µg		
Macrolides	Erythromycine (E) 15 µg	Flumequine (UB) 30 µg
	Spiramycine (SP) 100 µg	/
	Ofloxacin (OFX) 5 µg	/
Quinolones	Norfloxacine (NOR) 10 µg	
	Enrofloxacin (ENR) 5 µg	
	Acide nalidixique (NA) 30 µg	
	Ciprofloxacine (CIP) 5 µg	
Cyclines	Tétracycline (TE) 30 µg	
	/	Doxycycline (DO) 30 µg
Glycopeptides	Vancomycine (VA) 30µg	/
Polypeptides	Bacitracine (B) 10 UI	/
Sulfamides	Trimethoprim + Sulfaméthoxazole (SXT) 1,25/23,75 µg	
Phénicoles	Chloramphenicol (C) 30 µg	

9.3. Recherches complémentaires obligatoires

En vue de la recherche de souches rebelles ; *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthyciline (SARM) et *E. coli* productrices de β -lactamase à spectre élargi (BLSE), des tests complémentaires sont réalisés et résumés dans le tableau 27.

Tableau 27 : Différentes recherches complémentaires

	Tests de présomption	Tests de confirmation
<i>S. aureus</i>	Test de diffusion du disque de céfoxitine (30 μ g)	Test de screening à l'oxacilline (MH+4% NaCl+6 μ g d'oxacilline)
<i>E. coli</i>	Test de synergie entre un disque d'AMC (20/10 μ g) et de céphalosporine de 3 ^{ème} génération	Test du double disque

9.3.1. Recherche de la résistance de *Staphylococcus aureus* à l'oxacilline

9.3.1.1. Test de diffusion du disque de céfoxitine (30 μ g)

Technique: Pour une meilleure détection de la résistance des souches de *S. aureus*, les disques d'oxacilline (1 μ g) et de céfoxitine (30 μ g) sont testés simultanément au niveau de l'antibiogramme standard de *S. aureus*. Un contrôle de qualité est réalisé avec les souches ATCC 43300 et ATCC 29213 (figure 40). La lecture se fait comme suit :

Oxacilline (1 μ g)	Céfoxitine (30 μ g)	Interprétation
≥ 13 mm	≥ 22 mm	Souche OXA S
≤ 12 mm	≤ 21 mm	Souche OXA R

S : sensible ; R : résistante.

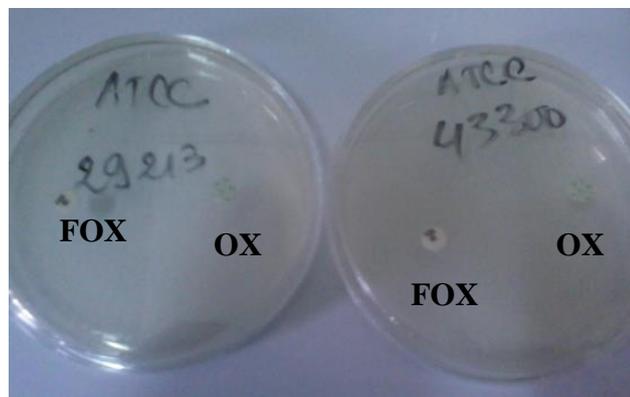


Figure 40 : Test de diffusion du disque de céfoxitine.

9.3.1.2. Test de screening à l'oxacilline

Milieu

- Gélose Mueller Hinton additionnée de 4% de NaCl, et de 6 µg/ml d'oxacilline.

La préparation de la solution d'oxacilline se fait de la manière suivante :

- Diluer 6mg d'oxacilline (poudre injectable d'un flacon de 1g) dans 10ml d'eau distillée stérile, puis faire une dilution au dixième. Répartir la solution obtenue à raison de 2ml par tube ; ainsi conditionnées ces solutions peuvent être conservées à 20°C pendant une semaine, au bout de laquelle elles doivent être renouvelées.

- Mettre 2ml de cette solution dans une boîte de 90mm de diamètre, ajouter 18ml de gélose Mueller-Hinton additionnée de 4% de NaCl. Mélanger en faisant des mouvements rotatoires.

Ensemencement

- L'ensemencement se fait par spot (figures 41a et 41b), en appliquant verticalement sur la gélose l'extrémité d'un écouvillon trempé dans la suspension bactérienne (ou ensemercer un cadran en entier). Des souches de référence sont testées dans les mêmes conditions : *S. aureus* ATCC 29213 souche sensible à l'oxacilline (MRSA -) et *S. aureus* ATCC 43300 souche résistante à l'oxacilline (MRSA +).

- Les boîtes Pétri sont incubées à 35°C en atmosphère normale pendant 24h.

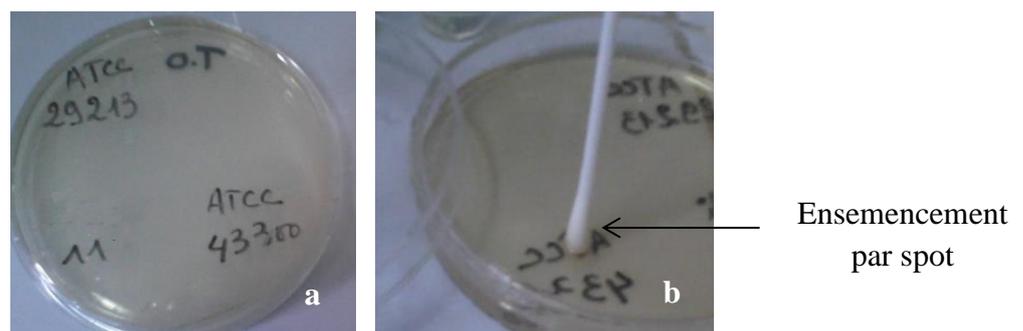


Figure 41 : Test de screening à l'oxacilline.

Lecture : La culture de plus d'une colonie de la souche test, suffit pour indiquer une résistance à l'oxacilline, impliquant une résistance à toutes les β -lactamines.

9.3.2 Recherche de la β -lactamase à spectre élargi (BLSE) chez *E. coli*

Définition d'une BLSE: Les β -lactamases à spectre élargi ou étendu désignent les enzymes « β -lactamases » produites par les entérobactéries, *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter sp.* Ces enzymes codent pour la résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération (céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) et aux monobactam (aztréonam), mais n'ont aucune activité vis-à-vis des céphamycines (céfoxitine, moxalactam) ni des carbapenemes (imipeneme).

9.3.2.1. Test de synergie (selon Jarlier et coll)

Principe: Les BLSE dérivées des enzymes de classe A (Ambler) sont inhibées par les inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactam et tazobactam).

Technique : La recherche de la β -lactamase à spectre élargi se fait dans les conditions standard de l'antibiogramme, en déposant le disque d'amoxicilline + acide clavulanique (AMC 20/10 μ g) à 30mm (centre à centre) d'un disque de céphalosporine de 3^{ème} génération. Dans notre cas, deux disques de C3G et une monobactam sont testés (figure 42): la céfotaxime (CTX 30 μ g), le ceftiofur (XNL 30 μ g) et l'aztréonam (ATM 30 μ g) et.

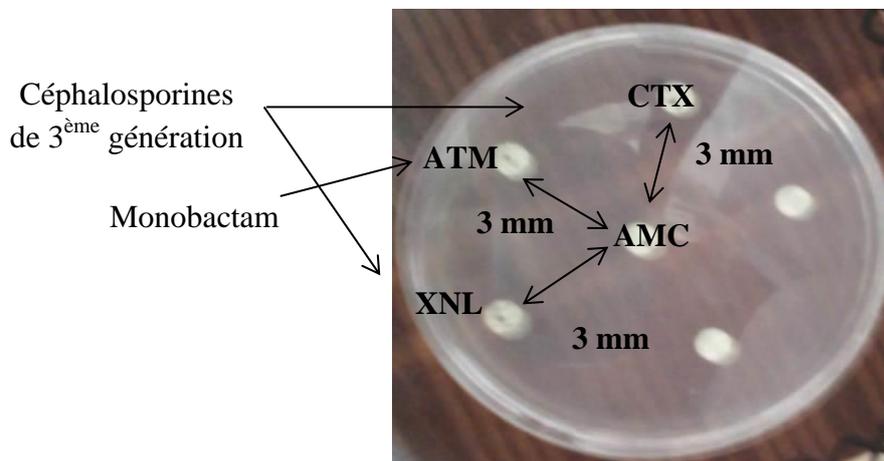


Figure 42 : Recherche de la BLSE par le test de synergie.

-L'incubation des boîtes Pétri se fait à 35°C pendant 18h.

-Un contrôle de qualité est réalisé dans chaque série d'analyses avec les souches *E. coli* ATCC 25 922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Lecture: La production d'enzyme se traduit sur l'antibiogramme classique par l'apparition d'une image de synergie ou bouchon de champagne entre les disques :

- Amoxicilline + acide clavulanique et la céfotaxime (AMC et CTX);
- Amoxicilline + acide clavulanique et l'aztréonam (AMC et ATM);
- Amoxicilline + acide clavulanique et le ceftiofur. (AMC et XNL).

9.3.2.2. Test de confirmation du double disque

Ce test est fait systématiquement devant :

- L'absence de synergie avec diminution des diamètres des C3G;
- La présence d'une résistance à l'ampicilline avec un diamètre <6mm, par contre l'AMC présente un diamètre d'inhibition.

Technique : Ce test se fait dans les conditions standards de l'antibiogramme.

-Un disque d'AMC et un disque de C3G sont déposés à une distance de 30mm centre à centre (figure 43);

-Les antibiotiques sont laissés se diffuser pendant une heure à la température ambiante. La boîte est déposée sur la paillasse couvercle vers le haut;

-Après 1h d'incubation, le disque d'AMC est ôté et est remplacé par un disque de CTX.

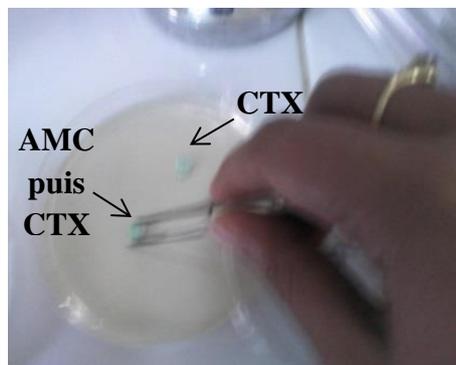


Figure 43 : Technique du double disque.

-De même, un contrôle de qualité est réalisé dans chaque série d'analyses avec les souches *E. coli* ATCC 25 922 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

Lecture : Le test du double disque est positif quand le diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3ème génération appliqué après pré-diffusion du disque de l'AMC est supérieur ou égal à 5mm par rapport au diamètre d'inhibition du disque de céphalosporine de 3ème génération.

10. Outils statistiques

10.1. Analyse descriptive

L'approche statistique a consisté en premier lieu en une analyse descriptive servant à décrire la population en question par ses grandeurs comme la moyenne et l'écart type.

a. La moyenne arithmétique : La moyenne arithmétique d'un ensemble de valeurs est la mesure de tendance centrale obtenue en additionnant ces valeurs et en divisant par leur nombre total. Il s'agit de la mesure numérique la plus importante pour décrire une population

b. L'écart-type : C'est la mesure de dispersion la plus couramment utilisée en statistique lorsqu'on emploie la moyenne pour calculer une tendance centrale. Il mesure donc la dispersion autour de la moyenne. En raison de ses liens étroits avec la moyenne, l'écart-type peut être grandement influencé si cette dernière donne une mauvaise mesure de tendance centrale.

10.2. Analyse de la variance (ANOVA à 1 facteur)

Elle a pour objectif d'étudier le comportement d'une variable quantitative à expliquer en fonction d'une autre variable qualitative (AZZOUZI, 2006).

10.3. Test Chi²

Il consiste à mesurer l'écart entre une situation observée et une situation théorique et d'en déduire l'existence d'une indépendance ou d'une dépendance entre deux caractères (en statistiques deux phénomènes sont dits indépendants si l'un n'agit pas sur l'autre) (AZZOUZI, 2006).

L'analyse est réalisée avec le logiciel Statistica (version 6). Une probabilité égale à 5% est retenue comme seuil significatif.