

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Microbiologie alimentaire et sante



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

Evaluation des conditions d'hygiène des surfaces
de travail de certaines boucheries de la ville de
Bejaïa : étude de la formation des biofilms par les
souches isolées

Présenté par :

Atmani Aida & Belkidar Dalia

Soutenu le : **16 Juin 2015**

Devant le jury composé de :

Mr. Bendjedou Kamel	MCB	Président
Mme. Bendali Farida	MCA	Encadreur
Mme. Louaileche-Tetili Fatiha	MAA	Examinatrice

Année universitaire : 2014 / 2015

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail nous témoignons toute notre reconnaissance et gratitude a notre promotrice Dr Bendali.f, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ce modeste travail

Aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer notre travail et pour le temps et les orientations accordées.

Nos sincères remerciements à tous les enseignants et les techniciens du laboratoire de microbiologie qui par leurs paroles, leurs conseils et leurs critiques nous ont guidés

Aux personnel des boucheries et points de vente (Marché bihebdomadaire Edimco) qui par leurs sympathies et coopérations nous ont permis de réaliser ce travail

Enfin, nous exprimons notre sympathie à tous ceux, qui de près ou de loin nous ont aidé à élaborer ce mémoire

Dédicaces

A ma très chère mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par de son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude, aucune dédicace ne serait assez éloquente pour exprimer mon ressentis.

A Mon père, qui peut être fier de trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

A la mémoire de mes grands parents, Ce travail est pour moi le fruit de leurs prières

A mes très chères sœurs Farah, Nfissa et son mari Tahar, qui n'ont cessé d'être la pour moi des exemples de générosité, d'amour et d'affection

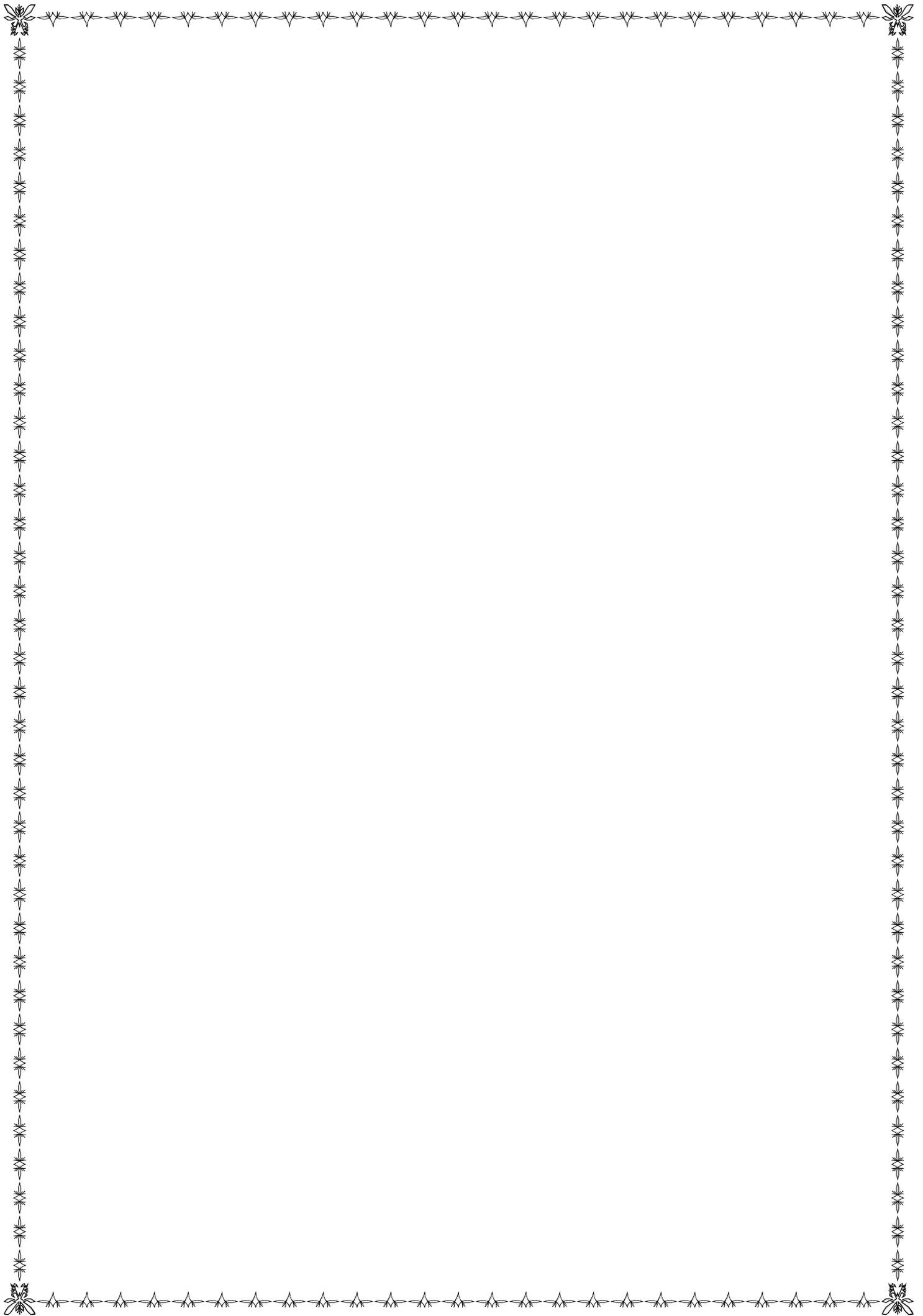
A mes oncles tantes cousins et cousines vous avez de près ou de loin contribués a ma formation

A ma meilleur amie et binôme Dalia, ensemble nous avons partagés d'agréables moments tout au long de la réalisation de ce travail que notre amitié durera jusqu'à l'infini

A mes très chères amis, Celia, Meriama, idir, hocine et lotfi et au bonheur que vous m'apportés

A toute la promotion MASTER II de microbiologie Alimentaire et santé

Aida



Dédicaces

J'ai l'honneur de dédié ce travail a :

A mes parents .Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour Dont ils ne cessent de me combler. Que dieu leur procure bonne santé et longue vie.

A ma mère qui est un magnifique modèle de par courage, sa détermination, et persévérance, pour ses sacrifices et son investissement dans ma réussite, mon épanouissement ainsi qu'à mon éducation à qui je n'ai pas souvent eu l'occasion de lui exprimé mes sincères reconnaissances et mon amour le plus profond.

A mon papa qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, encouragement reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

A la mémoire de mes grands parents « que dieu les accueille dans son vaste paradis »

A mes très chères sœurs : Assia et Sarah que j'aime infiniment et qui ont contribué dans mon parcours par leur soutien, affection, et leurs générosités encouragements

Ainsi qu'à mes beaux frère Halim et Ahmed.

A mes merveilleux neveux et niece : Rayane, Eliane, Nélia qui m'apporte la joie et le bonheur

A mes tante : Daouia et Sabiha que j'affectionne

A Djazia

A mes amis :Celia,Lotfi,Idir pour leurs encouragements amour et affections

A ma tres chère binôme et meilleurs amie « aida » avec qui j'ais eu l'immense plaisir et joie de partager avec elle ce modeste travail ,a son soutien permanant et son amitié depuis plus de huit ans

A tous mes collègues de la promotion Master II Microbiologie Alimentaire et Santé 2014 /2015.

Dalia

Liste des abréviations

JORA : Journal officiel de la république algérienne

IPA : Institut Pasteur Algérie

GC : Giolitti cantoni

FTAM : Flore Totale Aérobie Mésophile

MM: Mannitol Mobilité

TSI: Three Sugar Iron

CS : Citrate de Simmons

BN : Bouillon Nutritif

E. : Escherichia coli

MRS : Man Rogosa et Sharpe

S. : Staphylococcus

VRBL: Violet Crystal, Neutralred, Bile, Lactose

A: Absorbance

SFB: Sélénite-Cystéine

BHI: Brain Heart Infusion.

SL: *Salmonella*.

EC: Entérocoques

S: Souches

TIAC : Toxi-infections alimentaire collectives.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant de cycle de vie d'un biofilm.....	7
Figure 2 : Identification des bactéries lactiques.....	16
Figure 3 : Taux de la flore aérobie mésophile, au niveau des trois boucheries (B1-B2-B3) et 2 points de ventes (B4-B5) inspectés.....	20
Figure 4 : Taux des entérobactéries et coliformes fécaux (<i>E. coli</i> présumé) au niveau des 3 boucheries (B1-B2-B3) et 2 points de ventes (B4-B5) inspectés.....	20
Figure 5 : Nombre de souches de <i>S.aureus</i> identifiées sur les différentes surfaces.....	22
Figure 6 : Nombre de souches de <i>Salmonella</i> isolées sur les différentes surface des boucheries B2 et B4.....	25
Figure 7 : Nombre de souches d'entérocoques isolées des différentes surfaces.....	26
Figure 8 : Nombre (%) de coques et bacilles lactiques isolées des boucheries B1 et B2.....	27
Figure 9 : Nombre de souches de bacilles lactiques, classées en groupe, isolées des 2 boucheries B1 et B2.....	28
Figure 10 : Nombre de souches de bacilles lactiques, classées en groupe, isolées des différentes surfaces des boucheries B1 et B2.....	28
Figure 11 : Nombre de souches d'entérocoques et autres coques lactiques isolées des différentes surface des boucheries B1 et B2.....	29
Figure 12 : Taux de micro-organismes recherchés sur l'ensemble des échantillons (B1-B2-B3-B4-B5).....	30
Figure 13 : Photographie de biofilms dans des puits de microplaque en polystyrène de 96 puits après coloration au cristal violet (photo original).....	30
Figure 14 : Les moyennes de la capacité d'adhésion des 6 souches de <i>Salmonella</i> (SL1/SL6) et 10 souches des entérocoques (EC1 /EC10) sur les différentes surfaces de boucheries et point de ventes.....	31
Figure 15 : les moyennes des capacités d'adhésion de 16 souches de <i>S.aureus</i> sur les différentes surfaces de boucheries et points de vente.....	33
Figure 16 : les moyennes des capacités d'adhésions de 30 souches de bactéries lactique prélevées sur les différentes surface des 2 boucheries B1 et B2.....	35

Liste des tableaux

Tableau I : Dénombrement de la flore aérobie mésophiles totale (FTAM), entérobactéries, coliformes fécaux thèrmotholerant (<i>E.coli</i> presemptif).....	13
Tableau II : Lecture caractéristique de <i>Salmonella</i> et <i>E. coli</i> sur milieu Mannitol Mobilité.....	14
Tableau III : Lecture caractéristique de <i>Salmonella</i> et <i>E. coli</i> sur milieu TSI.....	15
Tableau IV : Lecture caractéristique de <i>Salmonella</i> et <i>E. coli</i> sur milieu Citrate de Simmons.....	15
Tableau V : Lecture caractéristique d' <i>E. coli</i> sur milieu urée indole.....	15
Tableau VI : Caractéristiques biochimique des différentes espèces identifier sur milieu TSI et citrate de simmons.....	24
Tableau VII : Estimation des résultats d'adhésion de <i>Salmonella</i>	31
Tableau VIII : Estimation des résultats d'adhésion des entérocoques.....	32
Tableau IX : Estimation des résultats d'adhésion des <i>S.aureus</i>	33
Tableau X : Estimation des résultats d'adhésion des bactéries lactique.....	35

Liste des tableaux en annexes

Annexe 1: Résultats obtenus des dénombrements et caractéristiques des souches recherchés

Tableau I : Résultats obtenus des dénombrements de la FTAM, entérobactéries, coliformes fécaux sur les différentes surfaces de boucheries.

Tableau II: Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entérocoques et bactéries lactiques, première boucherie (B1)

Tableau III : Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entérocoques et bactéries lactiques, deuxième boucherie (B2)

Tableau IV : Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entérocoques et bactéries lactiques, troisième boucherie (B3)

Tableau V : Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entérocoques et bactéries lactiques, point de vente (B4)

Tableau VI : Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, entérocoques et bactéries lactiques, point de vente (B5)

Tableau VII : Caractéristiques des souches isolées de *Staphylococcus aureus* de l'identification par le test de la coagulase et catalase

Tableau VIII: Caractéristiques obtenu lors de l'identification des Entérocoques sur Bouillon MRS à PH=9.6, bouillon MRS (NaCl= 6.5%), traitement thermique a 60°C pendant 30minutes et croissance a 44°C

Tableau IX: Caractéristiques obtenu lors de l'identification après coloration de Gram des coques lactique sur MRS plus cloche, MRS à PH=9.6, bouillon MRS NaCl=6.5%, traitement thermique a 60°C pendant 30minutes et croissance a 44°C

Tableau X : Caractéristiques obtenu lors de l'identification des bacilles lactique après coloration de Gram sur MRS plus cloche et croissance a 44°C

Tableau XI : caractéristiques biochimique des souches isolées sur hektoen lors de l'identification de *Salmonella* sur la mini galerie biochimique

Tableau XII : caractéristiques obtenus lors de l'identification de *E. coli et* sur mini galerie biochimique (TSI, Citrate de Simmons, Mannitol mobilité et urée indole) de souche isolés sur VRBL

Annexe 2 : Code descriptif des échantillons

Tableau I : Description des échantillons

Annexe 3: Composition des milieux de cultures (Selon fournisseurs)

Tableau I : Milieu Chapman (pH 7, 2)

Tableau II : Bouillon nutritif (BN, pH7, 4)

Tableau III : Bouillon Cœur Cerveille (BHI, pH7, 4)

Tableau IV: Gelose Slanetz Bartley (pH 7,2)

Tableau V : Bouillon MRS (de Man Rogosa et sharpe, pH 6,5)

Tableau VI : Milieu Roth (pH7)

Tableau VII : Giolitti et cantoni (GC, pH6, 9)

Tableau VIII : Eau physiologique (pH7, 2)

Tableau IX : Eau peptonnée Tamponnée (pH7, 2)

Tableau X : Milieu désoxycholate (pH7, 2) (CONDA)

Tableau XI : Sélénite-Cystéine (pH7, 2)

Tableau XII : Gélose M17 (pH7, 2)

Tableau XIII: Gelose Hektoen (pH7, 6)

Tableau XIV : VRBL (Violet Crystal, Neutralred, Bile, Lactose, pH6, 9)

Tableau XV: Gelose PCA (Plat Count Agar, pH7)

Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie bibliographique

Chapitre I : Filière viande et risques sanitaire

1. Boucherie.....	3
2. Viande.....	3
2.1. Définition et qualité.....	3
2.2. Microbiologie de la viande	3
2.2.1. Flore totale aérobie mésophile.....	4
2.2.2. Microorganismes pathogènes.....	4
2.3. Facteurs de développements.....	5
3. Toxi-infections alimentaires d'origine animal.....	5
3.1. Exemple de bactéries a l'origine de TIAC.....	5

Chapitre II : Biofilms

1. Définition.....	7
2. Etapes de formation sur surfaces abiotiques.....	7
2.1. Adhésion primaire réversible et non spécifique.....	7
2.2. Adhésion permanente irréversible et spécifique.....	8
2.3. Formation de microcolonies et sécrétion de la matrice extracellulaire.....	8
2.4. Maturation.....	8
2.5. Dispersion.....	9
3. Biofilms et filière viande.....	9
3.1. Quelques exemples de microorganismes formant des biofilms « négatifs ».....	9

Partie pratique

Chapitre I : Matériels et méthodes

1. Appréciation de l'hygiène des différents commerces de viandes.....	11
1.1. Prélèvements des surfaces.....	11
1.2. Description des échantillons.....	11
1.2.1. Prélèvements a partir des boucheries de proximité.....	11
1.2.2. Prélèvements au niveau du marché populaire bihebdomadaire (B4 et B5).....	12

1.3. Analyse microbiologique.....	12
1.3.1. Dénombrements.....	12
1.3.2. Recherche des bactéries pathogènes.....	13
2. Etude du potentiel de formation de biofilm des souches isolées.....	17
2.1. Préparation des cultures fraîches.....	17
2.2. Ensemencement des microplaques.....	17
2.3. Coloration au cristal violet et lecture.....	17

Chapitre II : Résultats et discussion

1. Appréciation de la qualité hygiénique.....	18
1.1. Boucherie N°1 (Amriw).....	18
1.2. Boucherie N°2 (Cartier Sghir).....	18
1.3. Boucherie N°3 (Centre ville).....	18
1.4. Marché populaire « Edimco ».....	19
2. Estimation de qualité hygiénique.....	19
2.1. Recherche et identification.....	21
2.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.1.2. Salmonella.....	23
2.1.3. Entérocoques.....	25
2.1.4. Bactéries lactiques.....	27
3. Capacités d'adhésion des souches identifiées.....	30
3.1. Souches pathogènes.....	30
3.1.1. <i>Salmonella</i>	32
3.1.2. Entérocoques.....	32
3.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.2. Souches lactiques.....	34
4. Comparaison du potentiel d'adhésion des souches lactiques et des souches pathogènes.....	37
Conclusion.....	38

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

L'un des facteurs de risque les plus importants à maîtriser, concernant à la fois la qualité et la sécurité des produits, est sans conteste la contamination bactérienne. En effet les bactéries, qui peuvent être responsables de l'altération des denrées alimentaires, peuvent aussi par leur présence, par la synthèse de métabolites toxiques ou de toxines, constituer un risque majeur pour la santé du consommateur. Ce risque bactérien concerne notamment les denrées alimentaires d'origine animale telles que la viande rouge et la volaille.

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime que près de 30% des habitants des pays industrialisés souffrent chaque année d'une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (Bailly et *al.*, 2012). Tous ces cas de TIAC sont susceptibles d'être provoqués par les viandes rouges et/ou la volaille. Sur 1032 foyers déclarés en 2010 en France, 22% ont été associés à la consommation de produits carnés en général (viande de boucherie, volailles, viandes de charcuterie) (Bailly et *al.*, 2012).

Aux USA, le nombre annuel de cas de toxi-infections alimentaires est estimé à 38,6 million (Ghafir et Daube, 2007). 71,7% des mortalités survenues seraient dus à des bactéries, dont la majorité d'entre elles provient le plus souvent des denrées alimentaires d'origine animale (Bourgeois et *al.*, 1996).

En Afrique subsaharienne, les toxi-infections alimentaires ne sont pas rares, mais leurs estimations sont largement sous-évaluées par les autorités sanitaires et leurs origines sont rarement élucidées du fait de la faiblesse des moyens de diagnostic notamment bactériologiques. Cette situation prévaut aussi en Algérie, où les données relatives aux TIAC sont très limitées. En effet, peu de cas ont été recensés et les statistiques sous-estiment le nombre de cas réels.

Les deux principaux agents bactériens incriminés dans les toxi-infections alimentaires (en termes de nombre de cas totaux et de nombre d'hospitalisations) sont *Salmonella* et *Campylobacter*, viennent ensuite en nombre d'hospitalisations : *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 entérohémorragique, *Staphylococcus* et *Yersinia enterocolitica*. *Salmonella* (30,6 %), *Listeria monocytogenes* (27,6 %), *Campylobacter* (5,5%) et *E. coli* O157 entérohémorragiques (2,9 %) sont estimés comme étant responsables des plus fortes mortalités aux USA (Mead et *al.*, 1999).

La formation de biofilms est liée à la présence des bactéries sous forme planctonique dans l'environnement et leur capacité d'adhérer sur de nombreuses surfaces (Habimana *et al.*, 2010).

Le biofilm est une forme de stratégie de survie bactérienne dans un état hostile. Le comportement des bactéries incluses dans un biofilm est très différent des bactéries planctoniques. Les bactéries contenues dans la structure du biofilm sont généralement plus résistantes aux agents antimicrobiens que les bactéries planctoniques, et peuvent varier d'un organisme à un autre (Morar, 2011).

La fixation des bactéries et la formation de biofilms au niveau des surfaces en contact avec les aliments, peut devenir une source potentielle de contamination de ces derniers. Des bactéries pathogènes pourraient être incorporées dans le biofilm, et sous certaines conditions elles peuvent se détacher, se propager et contaminer d'autres surfaces (Sofos, 2014) et transmises aux aliments et ainsi provoquer des toxi-infections alimentaires, ce qui constitue un réel problème de santé publique.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a comme objectif, dans un premier temps d'évaluer le niveau d'hygiène prévalent au niveau de certains commerces de viande (boucherie de proximité et marché populaire) en effectuant des prélèvements, en vue d'une analyse bactériologique, au niveau des différentes surfaces en contact avec la viande, et dans un deuxième temps de tester les souches isolées quant à leur capacité à adhérer et à former des biofilms.

Le document est structuré en une synthèse bibliographique, relative à la contamination bactérienne des viandes et au risque sanitaire y découlant et au phénomène « biofilm », suivie par la description de la partie matériel et méthodes et enfin les résultats obtenus sont illustrés accompagnés de leur discussion et des principales conclusions auxquelles ils nous ont amené.

1. Boucherie

Une boucherie est un établissement commercial de vente en détail de la viande d'animaux d'élevage (Hachette, 2006). Les connaissances et le niveau de formation des gestionnaires de ces établissements en ce qui concerne l'hygiène personnelle et générale sont d'une importance particulière pour assurer la santé et la sécurité du consommateur. Ils jouent un rôle majeur pour assurer la sécurité alimentaire tout au long de la chaîne de production, transformation, stockage et de préparation du produit carné. Une mauvaise manipulation et le mépris des mesures d'hygiène par les gestionnaires contribuent fréquemment à des épidémies, de maladies d'origine alimentaire, causées par *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et les bacilles à Gram négatif telles qu'*Escherichia coli* (*E. coli*) et *Salmonella* spp. (Ghafire et Daube, 2009).

2. Viande

2. 1. Définition et qualité

La viande est le produit de transformation du muscle après la mort de l'animal. Sa qualité prend en compte 4 composantes : la qualité technologique, la qualité organoleptique, la qualité nutritionnelle et la qualité hygiénique. Les trois premières composantes ont été décrites chez le bovin par Salifou *et al.* (2013). La quatrième composante est essentiellement liée à la santé publique et constitue un critère primordial pour la sécurité sanitaire du consommateur. De ce fait, la viande ne doit contenir aucun résidu toxique, aucun parasite, ni être le siège d'un développement bactérien susceptible de produire des éléments nocifs (Coibion, 2008).

La viande étant une denrée périssable, elle a été traditionnellement considérée comme le véhicule de nombreuses maladies d'origine alimentaire chez l'Homme (Fosse *et al.*, 2006). Sa composition en eau et en protéines, de haute valeur biologique, fait qu'elle est une niche très favorable au développement des microorganismes (Benaissa, 2011). De même, la transformation de l'animal vivant en carcasse puis en viande s'accompagne généralement d'une contamination microbienne au cours du procédé (Cartier, 2004).

2. 2. Microbiologie de la viande

De nombreuses recherches microbiologiques ont été menées sur la viande et ont permis d'isoler par stade de production, plusieurs types de microorganismes selon qu'il s'agit

de la viande fraîche, de la viande hachée ou des préparations à base de viande (Dennaï *et al.*, 2001; Benaïssa, 2011 ; Biswas *et al.*, 2011 ; Kpodékon *et al.*, 2013). La connaissance de ces derniers est indispensable à une bonne maîtrise de la contamination pour assurer la sécurité sanitaire des consommateurs de viandes.

La microflore initiale de la viande regroupe les microorganismes provenant de l'animal vivant et après abattage, c'est-à-dire jusqu'à l'habillage mais avant lavage (Fernandes, 2009). Ces microorganismes proviennent soit des animaux eux-mêmes par contact direct via le cuir, les pattes, les sabots ou le tractus digestif, soit de l'eau utilisée, de l'Homme, de la méthode de travail, du milieu ou du matériel utilisé par contact indirect (Corry, 2007 ; Fernandes, 2009).

2.2.1. Flore totale aérobie mésophile

La flore totale aérobie mésophile regroupe des microorganismes formant des colonies dénombrables après leur multiplication dans des conditions de laboratoire définies (Bonney *et al.*, 2002). Il s'agit des microorganismes aérobies pouvant se multiplier dans des conditions ambiantes à 30°C et ne constituant pas une famille bactérienne particulière. Cette flore regroupe des espèces d'entérobactéries, de *Bacillus*, de staphylocoques, de *Pseudomonas*, de bactéries lactiques ou d'autres agents éventuellement pathogènes (Ghafir et Daube, 2007).

2.2.2. Microorganismes pathogènes

Les bactéries pathogènes isolées dans les viandes sont: *Bacillus cereus* (taux relativement faible sur les carcasses), *Campylobacter* spp. (rencontré plus fréquemment dans la volaille), *Escherichia coli* et principalement *E. coli* O157: H7 (retrouvée dans la viande bovine), *Listeria monocytogenes* (taux plus élevé souvent dans les viandes hachées), *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* (rencontrés à un taux plus élevé dans la viande porcine) (Ghafir et Daube, 2007; Fernandes, 2009; Bailly *et al.*, 2012). *Aeromonas* spp. se développe uniquement sur les viandes qui ont été emballées sous vide ou sous atmosphère modifiée (Fernandes, 2009). *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus* et *Bacillus anthracis* sont des espèces pouvant provenir de l'animal malade et dont leur ingestion à travers la consommation de viande est parfois pas cuite à cœur entraîne respectivement chez le consommateur la tuberculose, la brucellose et la maladie du charbon (Warris, 2000; Lawrie et Ledware, 2006). Ces maladies ont tendance à être localisées dans certaines régions du monde. De toutes ces

flores, les plus incriminées dans les toxi-infections alimentaires en Europe et aux USA sont : *Salmonella* sp. et *Campylobacter* (European Food Safety Authority, 2006 ; Ghafir et Daube, 2007).

2. 3. Facteurs de développement

Le développement de la microflore initiale est influencé par: le nombre initial de microorganismes présents sur la carcasse (principalement la flore d'altération), les espèces ou les souches présentes, la température de conservation, le pH (lié au taux de glucose dans la viande) particulièrement pour les viandes conservées sous vide ou sous atmosphère modifiée et l'humidité relative qui influence uniquement les viandes non emballées (Corry, 2007).

Les facteurs les plus importants sont le pH, la température, l'activité de l'eau (aw), l'humidité relative et le potentiel d'oxydoréduction (rH) (Lawrie et Ledward, 2009).

3. Toxi-infections alimentaires d'origine animale

Même si elles ne sont pas rares, les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont très souvent bénignes, dominées par des troubles digestifs dont les malades récupèrent sans séquelles en quelques jours. La source principale de ces toxi-infections est donc l'alimentation d'origine animale. Les différents agents bactériens peuvent être des bactéries zoonotiques c'est à dire qu'ils sont susceptibles de se transmettre naturellement des animaux à l'Homme, il s'agit principalement de microorganismes présents dans le tractus intestinal des bovins, volaille et porc (Padungtod *et al.*, 2002).

3.1. Exemples de bactéries à l'origine de TIAC

L'un des plus importants microorganismes pouvant provoquer des TIAC est *S. aureus*, une espèce retrouvée chez 50% des adultes (porteurs sains) ou au niveau des plaies cutanées infectées. Ces sujets peuvent être source de contamination de la viande rouge et de la viande de volaille lors de sa manipulation (panaris, furoncles). La TIAC est due à au pouvoir invasif de *S. aureus* et à sa résistance à la phagocytose et la production de toxines thermostables (pouvant s'accumuler dans l'aliment) ainsi qu'à son pouvoir adhésif et à former des biofilms (Projan et Nocick, 1997). En effet, c'est l'agent pathogène le plus isolé des surfaces en contact avec la viande et la volaille où il peut adhérer et former des biofilms (Hermans, 2009).

Le deuxième micro-organisme le plus incriminé dans les TIAC est *Salmonella* qui peut se développer sur la plupart des aliments d'origine animale. La contamination peut avoir lieu par contact avec des matières fécales (coquilles d'œufs) ou lors de la préparation (œufs, produits à base d'œufs, volailles, viande). L'habitat naturel des salmonelles est l'intestin de l'animal et de l'Homme (Denis, 2003). Ces bactéries sont des agents pathogènes responsables de foyers couramment associés à la consommation de viande de volaille contaminée. Les salmonelles sont facilement détruites par la chaleur, de ce fait les aliments les plus souvent incriminés sont des aliments consommés sans cuisson (mayonnaise, charcuterie) ou après une cuisson faible. La consommation de steaks hachés insuffisamment cuits ou crus pour les populations sensibles (jeunes enfants, personnes âgées et personnes immunodéprimées) peut aussi être à l'origine de l'apparition de cas de salmonellose (Gledel, 1978). En plus de son pouvoir pathogène, *Salmonella* a la capacité de former des biofilms, lui procurant une persistance dans différents environnements.

1. Définition du biofilm

Le terme « biofilm » a été proposé pour la première fois en 1978 par Jhon William Costerton et ses collaborateurs et définis comme étant des populations de bactéries adhérentes les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces et englobées dans une matrice (Costerton *et al.*, 1978). Depuis, la notion de biofilm n'a cessé d'évoluer en fonction des avancements des travaux visant la compréhension profonde de ce phénomène

Ces dernières années, un biofilm est considéré comme une communauté microbienne sessile composée de cellules irréversiblement attachées à une surface, contenue dans une matrice de substances polymériques extracellulaires produites par elles mêmes, et présentant un phénotype modifié concernant le taux de croissance et la transcription des gènes (Lazar, 2011).

2. Etapes de formation sur surfaces abiotiques

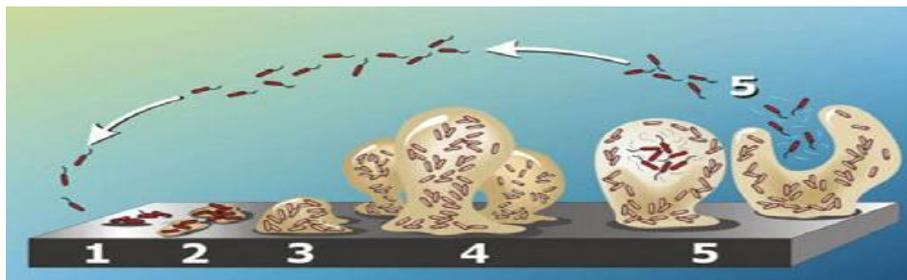


Figure 1 : Schéma représentant le cycle de vie d'un biofilm. Etape 1 : adhésion initial (réversible) étape 2 : adhésion permanente (irréversible) ; étape 3 : formation de microcolonie et sécrétion de la matrice extracellulaire ; étape 4 : maturation du biofilm et étape 5 : dispersion des cellules (Stoodley *et. al*).

2.1 Adhésion primaire réversible et non spécifique

La formation d'un biofilm débute d'abord par le conditionnement de la surface qui s'amorce souvent par une adsorption non spécifique de molécules organiques et d'ions présents dans le milieu modifiant certaines de ses propriétés de surface (Kumar et Arnand, 1998). Cette adhésion réversible est caractérisée par l'adsorption faible des cellules bactériennes sur la surface par des liaisons chimiques non covalentes de type Van der Waals, électrostatique et hydrophobe (Costerton *et al.*, 1981).

2.2. Adhésion permanente irréversible et spécifique

Cette adhésion stable est rendue possible par la sécrétion de polymères extracellulaires formant des ponts de fixation entre la cellule et la surface (Bellon-Fontaine et Cerf, 1991). Ces exopolymères permettent de maintenir le biofilm assemblé tout en le protégeant contre les biocides et certaines conditions de vie défavorables (hautes températures, séchage). En plus, il agit comme un système d'échange d'ions afin de concentrer les nutriments pour la multiplication des cellules (Dreeszen, 2003). Dans cette étape les interactions mises en jeu sont de type ionique, hydrogène, covalentes et hydrophobes (Kumar et Anand, 1998).

2.3. Formation de microcolonies et sécrétion de la matrice extracellulaire

Les micro-organismes se divisent en formant des microcolonies. A partir d'une concentration suffisamment dense d'individus, ils commencent la sécrétion de la matrice extracellulaire. Ces microorganismes sont englobés dans un matériel adhésif et mucoïde (Kodjikian et Burillon, 2003). Selon l'espèce impliquée, une microcolonie peut se composer de 10 à 25 % de la matrice exopolysaccharidique (Costerton, 1999).

2.4. Maturation

Le biofilm grandit et mûrit, s'épaississant jusqu'à devenir macroscopique en conditions optimales. La maturation du biofilm est divisée en deux phases ; la première phase est marquée par des régulations importantes de gènes, engendrant un changement marqué du phénotype par rapport aux formes planctoniques. Elle concerne essentiellement des gènes codant pour des protéines impliquées dans des métabolismes anaérobies ; cela suggère la faible présence d'oxygène, surtout dans les zones les plus proches du support. La seconde phase est marquée par des synthèses protéiques (Clutterbuck *et al.*, 2007).

La communication intercellulaire (*quorum sensing*) est également indispensable lors de la formation et la maturation du biofilm (Irie et Parsek, 2008). Des études ont montré que les appendices de surface, nécessaires dans l'étape initiale de l'adhésion des micro-organismes aux surfaces, avaient tendance à disparaître lors de l'étape de maturation du biofilm, laissant place à d'autres déterminants qui permettent la structuration et le maintien du biofilm (Costerton, 1995; Filloux et Vallet, 2003).

2.5 Dispersion

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, des formes planctoniques sont libérées dans le milieu extérieur. Cette dernière étape se produit lors du vieillissement du biofilm, ou lors de certains stress ou carences (Davey, 2003). Cet auteur a également rapporté que la production de biosurfactants (rhamnolipides) pourrait aussi favoriser la dispersion des cellules de la matrice du biofilm.

La dispersion des cellules du biofilm mature pourrait aussi être sous l'influence du système de communication intercellulaire où une augmentation de la concentration en molécules inductrices serait responsable de la régulation de la production d'enzymes de dégradation de la matrice extracellulaire (lyse) (Stoodley *et al.*, 2002).

3. Biofilm et filière viande

Très peu d'études ont été consacrées de manière spécifique aux biofilms qui se développent dans les ateliers de transformation de la viande. Pourtant, il est connu depuis une longue date que toutes les surfaces des environnements de fabrication depuis l'abattoir jusqu'au poste d'emballage de l'atelier de découpes sont colonisées par des micro-organismes et notamment par des bactéries spécifiques à la filière viandes. Il est tout à fait intéressant de constater que les travaux qui ont tenté de chercher sur les murs des ateliers de découpe, sur le sol de ces mêmes ateliers, sur les tapis convoyeurs, sur les bacs d'entreposage... ect. ont tous montré la présence de ces flores spécifiques à la filière viandes. Tout ce qui a été dit à propos de la colonisation des surfaces en général est parfaitement valable pour ces flores (Labadie, 2001). En effet, il ya de nombreux itinéraires pour une contamination par des agents pathogènes, mais plus de 27% d'une telle contamination est associée à la contamination de l'équipement et à la contamination croisée (Liu *et al.*, 2010). Une grande partie de cette contamination peut être attribuée à la présence de biofilms sur les surfaces de contact alimentaire (Xu *et al.*, 2013).

3.1. Quelques exemples de microorganismes formant des biofilms « négatifs »

Les biofilms dit « négatifs » sont des biofilms formés par des microorganismes indésirables, qui lorsqu'ils sont présents sur les équipements peuvent être à l'origine d'une contamination des produits et/ou d'une détérioration du matériel sur lequel ils s'installent la

présence de ces biofilms a un impact considérable dans l'industrie agro-alimentaire telle que l'industrie de transformation de la viande. Un biofilm peut se mettre en place en quelques heures et permettre ainsi aux bactéries qui s'y trouvent de devenir résistantes aux agents extérieurs engendrant d'éventuelles contaminations (Carpentier et Cerf, 1993).

En plus des bactéries pathogènes retrouvées (*S. aureus*, *Salmonella*), la viande renferme une flore d'altération, pathogène opportuniste et une flore d'altération dont les bactéries lactiques et *E. coli*. Cette dernière étant l'espèce bactérienne prédominante dans l'intestin, sa présence dans la viande et la volaille est considérée comme une indication de contamination fécale lors de la production et de la transformation de la viande crue (Eslava et al., 2003). En plus d'adhérer à la surface cellulaire, ce microorganisme colonise les surfaces inertes peu importe leurs compositions (Tuttle et al., 1999).

Par contre, les bactéries lactiques sont connues comme étant bénéfiques cependant elles sont connues aussi pour leur pouvoir de contamination et de détérioration des aliments a base de viande (Mintz et Du Bois, 2002). Ces bactéries sont capables de former des biofilms sur des différentes surfaces grâce à leur pouvoir d'adhésion (Sci et al., 2001). Parmi elles, seuls les entérocoques ont un statut controversé entre agents bénéfiques, indicateurs de contamination fécale et pathogènes opportunistes et dont l'espèce généralement rencontrée dans les aliments est *Enterococcus faecalis* (Tamine, 2002; Ho et al., 2007).

1. Appréciation de l'hygiène des différents commerces de viandes

Des prélèvements sont effectués au niveau de trois boucheries situées respectivement à Aamriw, quartier Sghir et au Centre ville (W. Béjaia), ainsi que chez deux vendeurs au marché populaire bihebdomadaire «EDIMCO» (W. Bejaia). Avant prélèvement, une inspection de l'état d'hygiène et des pratiques de découpe et d'entreposage de la viande au niveau des lieux de prélèvements est effectuée.

1.1. Prélèvements de surfaces

Les prélèvements sont effectués avec port de blouse et de gants. Le raclage des surfaces est réalisé à l'aide d'écouvillons stériles imbibés d'eau physiologique (NaCl 8,5 g/l) stérile. Les écouvillons sont par la suite introduits dans des tubes à essai contenant 5 ml de différents milieux d'enrichissement : Giolitti-Cantoni (GC, HIMEDIA, annexe 3), eau peptonée (peptone 1 g/l, annexe 3) et Rothe (IPA, annexe 3) ainsi que bouillon de de Man, Rogosa et Sharpe (préparation avec ingrédients, annexe 3) pour la recherche de: *Staphylococcus aureus*, salmonelles, entérocoques et des bactéries lactiques respectivement. En plus, un écouvillon, ayant servi à un prélèvement mixte (différentes surfaces) est introduit dans un tube de 9 ml d'eau peptonée (Biokar, annexe 3) pour le dénombrement des différentes flores : flore totale aérobie mésophile (FTAM), entérobactéries et coliformes fécaux. Les tubes contenant l'écouvillon sont bien agités et étiquetés (date, lieu, code, milieu) (Guiraud, 2003).

1. 2. Description des échantillons

1.2.1. Prélèvements à partir des boucheries de proximité

Vingt et un (21) échantillons sont prélevés de chaque boucherie (B1, B2, B3) à partir de cinq surfaces différentes en contact avec la volaille et /ou la viande rouge : hachoir (A1) réfrigérateur (A2), ustensiles de découpe (A3), table de découpe en bois (A4) et table d'entreposage en acier inoxydable (A5); excepté pour la boucherie E3 qui ne disposait pas de table en acier inoxydable (A5). Au niveau de chaque surface, quatre prélèvements sont effectués pour la recherche de *S. aureus*, salmonelles, bactéries lactiques et des entérocoques respectivement, ce qui représente 20 échantillons/ boucherie ; excepté pour la boucherie B3 où on a uniquement 16 échantillons. Un échantillon mixte est constitué en réalisant des prélèvements au niveau des cinq surfaces en utilisant un même écouvillon. Ce qui porte le

nombre d'échantillons à 21 (cas de B1 et B2) et à 17 (cas de B3). Cela porte le nombre total d'échantillons à 59 échantillons (21 échantillons/ B1+ 21 échantillons/B2+ 17 échantillons/B3), tel qu'indiqué dans (annexe2 , tableau I)

1.2.2. Prélèvements au niveau du marché populaire bihebdomadaire (B4 et B5)

Dix-sept (17) échantillons sont prélevés au niveau du point de vente B4. Huit (8) sont prélevés sur deux surfaces en contact avec le Bouzelouf (recherche des 4 flores citées plus haut): table d'exposition recouverte de nylon blanc (A'2) et ustensiles de découpe (A3). Les 8 autres échantillons sont prélevés sur 2 surfaces en contact avec la volaille : table de découpe en bois (A4) et surface en acier inoxydable (A5). En plus d'un prélèvement mixte effectué sur les quatre surfaces (Em4).

Douze (12) échantillons sont prélevés au niveau du point de vente B5 à partir de 3 surfaces en contact avec de la viande rouge (4 flores recherchées/3 surfaces): table d'exposition recouverte de nylon blanc (A'2), ustensiles de découpe (A3), table en bois (A4). En plus d'un prélèvement mixte effectué sur les 3 surfaces, tel qu'indiqué dans (annexe2, tableauI)

1.3. Analyse microbiologique

1.3.1. Dénombrement

Une série de dilutions décimales est préparée en inoculant 9 ml d'eau physiologique stérile avec 1 ml de la solution mère puis successivement à partir d'une dilution à une autre. La solution d'épuisement de l'écouvillon, ayant servi au prélèvement mixte, est considérée comme la solution mère (dilution 1/10)

Tableau I: Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FTAM), entérobactéries, coliformes fécaux thermotolerants (*E. coli* présumé) (Guiraud, 2003).

Flore	Milieu	Ensemencement	Incubation
FTAM	PCA (Plate Count Agar; Liofilchem, annexe 3)	1 ml des dilutions (10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) est ensemencé en masse	30°C / 72 h
Entérobactéries	Déoxycholate (Conda, annexe 3).	1 ml des dilutions (10^{-3} et 10^{-4}) est ensemencé en masse	37°C / 24-48 h
Coliformes fécaux	VRBL (gélose lactosée, biliée au cristal violet et au rouge neutre; Conda, annexe 3)	1 ml des dilutions (10^{-2} et 10^{-3}) est ensemencé en masse	44°C/ 24-48 h

1.3.2. Recherche des bactéries pathogènes et lactiques

- Recherche des *S. aureus*

Des isollements à partir des bouillons GC présumés positifs (noircissement), ayant été inoculés lors des prélèvements au niveau de chaque surface et servis à l'enrichissement sont réalisés en stries à l'aide d'une pipette Pasteur sur de la gélose Chapman (Liofilchem, annexe 3) incubée à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). L'identification est effectuée en réalisant une coloration de Gram, des tests de recherche de la catalase et de la coagulase.

➤ Test de la catalase

Sur une boîte de gélose Chapman une goutte de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 3V est déposée à l'aide d'une pipette Pasteur en contact avec une colonie caractéristique ; l'apparition d'une effervescence (bulles de gaz) traduit la présence d'une catalase (Larpen, 1997).

➤ Test de la coagulase

Des colonies caractéristiques sur la gélose Chapman sont repiquées dans du bouillon BHI (Brain Heart Infusion, annexe 3) et incubé à 37°C/ 24 h. Au terme de la période d'incubation, 0,5 ml de la culture en BHI (trouble) sont mélangés avec 0,5 ml de plasma humain (hôpital Khalil Amrane, Béjaia) dans des tubes à hémolyse et incubés à 37°C. La lecture est effectuée après 2, 4, 6 et 18 h. La présence d'une coagulase se traduit par la prise en masse partielle ou totale du plasma (Larpent, 1997).

-Salmonelles

Un enrichissement à partir du milieu de pré-enrichissement (eau peptonée), ayant été inoculé lors des prélèvements au niveau de chaque surface, présumé positif (trouble) est effectué dans du bouillon au sélénite (SFB, IPA, annexe 3) et incubé à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). Un isolement en stries est par la suite réalisé à partir du bouillon SFB, présumé positif (trouble), à la surface d'une gélose Hecktoen (IPA, annexe3) Les boîtes sont incubées à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). L'identification des salmonelles et *E. coli* est effectué à l'aide d'une mini-galerie biochimique. A partir de colonies caractéristiques sur géloses Hecktoen et VRBL, ayant servies au dénombrement, des tests d'identification biochimiques sont réalisés en mettant en évidence des caractères spécifiques.

➤ **Mobilité et fermentation du mannitol**

La mobilité et la fermentation du mannitol sont étudiées en utilisant de la gélose mannitol-mobilité (Conda, annexe 3), coulée en culots dans des tubes à essai, et ensemencés en pique centrale à partir d'une culture fraîche (24 h) à l'aide d'une pipette Pasteur et incubée à 37°C/ 24 h. La lecture est réalisée tel qu'indiqué dans le tableau II.

Tableau II : Lecture caractéristique de *Salmonella* et *E. coli* sur milieu mannitol mobilité

	Fermentation du mannitol	Mobilité
<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	Milieu jaune	Croissance aux abords de la pique centrale

➤ **Fermentation du glucose, lactose et saccharose ainsi que la production de H₂S**

Un ensemencement, à partir d'une culture fraîche (24 h), est réalisé dans des tubes contenant le milieu TSI (Riofilckem, annexe 3), coulé sous forme de pente et culot, en pique centrale dans le culot et en stries sur la pente et incubés à 37°C/ 24 h. La lecture est réalisée tel qu'indiqué dans le tableau III.

Tableau III: Lecture caractéristique de *Salmonella* et *E. coli* sur milieu TSI

	Pente (Lactose /Saccharose)	Culot (Glucose)	H₂S
<i>Salmonella</i>	Rouge (-)	Jaune (+)	Noircissement (+)
<i>E. coli</i>	Jaune (+)	Jaune (+)	Pas de noircissement (-)

(-) : Négatif (+) : Positif

➤ Utilisation du citrate comme seule source de carbone

De la gélose Citrate de Simmons (Conda, annexe 3), coulée sous forme d'une longue pente, est ensemencée en stries à partir d'une culture fraîche (24 h) et incubée à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). La lecture est réalisée tel qu'indiqué dans le tableau IV.

Tableau IV: Lecture caractéristique de *Salmonella* et *E. coli* sur milieu Citrate de Simmons

	Citrate de Simmons
<i>Salmonella</i>	Variable selon l'espèce Vert (-) bleu (+)
<i>E. coli</i>	Vert (-)

(-) : négatif (+) : positif

➤ Production d'une uréase et d'indole

Du bouillon Urée-Indole de Fergusson (IPA, annexe 3) est ensemencé à partir d'une culture fraîche (24 h) et incubé à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). La lecture est réalisée tel qu'indiqué dans le tableau VI. Vu le manque de milieu Urée-Indole uniquement les souches présumées *E. coli* sont testées sur ce milieu.

Tableau V : Lecture caractéristique d'*E. coli* sur milieu urée indole

	Hydrolyse d'Urée	Production d'Indole
<i>E. coli</i>	Rouge (+)	Anneau rouge (+)

(+) : positif (-) : négatif

➤ Entérocoques

Un enrichissement, à partir des tubes de bouillon de Rothe présumés positifs, ayant été inoculés lors des prélèvements à partir de chaque surface, est effectué en repiquant 1 ml dans

du bouillon EVA-Litzky (Conda, annexe 3), un milieu sélectif confirmatif de la présence d'entérocoques, incubé à 37°C/ 24 h (Guiraud, 2003). A partir des bouillons EVA-Litzky positifs (trouble), un isolement en stries est réalisé à la surface d'une gélose de Slanetz-Bartley (IPA, annexe 3) incubée à 37°C/ 24 h (Larpent, 1997).

➤ Bactéries lactiques

Un isolement à partir des bouillons MRS (préparation avec ingrédients, annexe 3), ayant été inoculés lors des prélèvements au niveau de chaque surface et servi à l'enrichissement, présumés positifs est réalisé en stries sur de la gélose MRS (pH 5,5) et M17 (pH 6,5) (Conda, annexe 3) et incubés à 30°C/ 24-48 h (Guiraud, 2003).

Après coloration de Gram et test de la catalase ,selon qu'il s'agit d'un coque ou d'un bâtonnet, d'autres tests d'identification présomptifs du genre sont effectués (figure 2) (Guiraud, 2003).

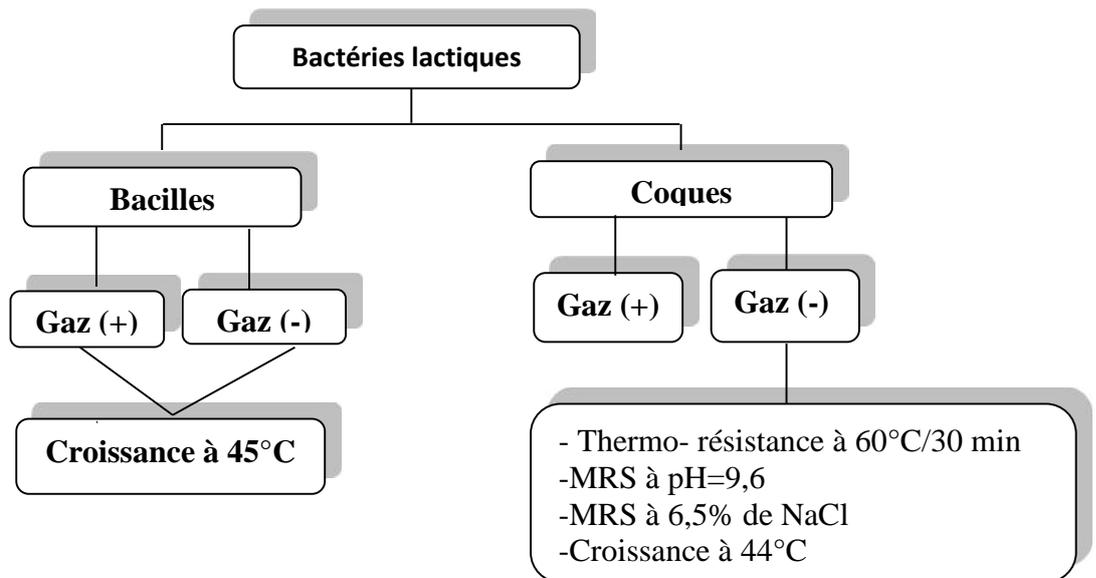


Figure 2 : Identification des bactéries lactiques

2. Etude du potentiel de formation de Biofilms des souches isolées

2.1. Préparation des cultures fraîches

Des souches lactiques (y compris les entérocoques) et pathogènes (*Staphylococcus aureus* et salmonelles), sélectionnées lors de l'identification, sont repiquées dans des tubes contenant respectivement du MRS (bactéries lactiques), du BHI (staphylocoques) et du bouillon nutritif (salmonelles) et incubés à 37°C/ 24 h.

2.2. Ensemencement de la microplaque

La formation de biofilms est testée sur des microplaques en polystyrène (zellkultur test plate 96U 1Stk, suisse) stérile suivant la méthode d'O'Toole *et al.* (1999). Les puits de la microplaque, préalablement remplis avec 100 µl de bouillon sont ensemencés en quadruplé pour les bactéries pathogènes (quatre répétitions par souche dans la même microplaque) et en triplé pour les bactéries lactiques (trois répétitions par souche dans la même microplaque) avec 100 µl de chaque suspension bactérienne fraîche, puis la microplaque est incubé à 37°C/ 24 h. Les autres puits contenant 200 µl de bouillon stérile sont utilisés comme témoins négatifs.

2.3. Coloration de la microplaque au cristal violet et lecture

Après incubation, les suspensions bactériennes dans les puits, sont aspirées soigneusement, puis rincés une fois avec 200 µl d'eau physiologique stérile. Par la suite, les cellules fixées sont colorées avec 200 µl d'une solution de cristal violet (Biochem, Quebec, Canada) à 0,1% (m/v) pendant 20 min, puis lavées avec 200 µl de l'eau physiologique stérile jusqu'à obtention d'une couleur claire du liquide de lavage. Enfin, les puits de la microplaque sont remplis avec 200 µl d'éthanol pour solubiliser le colorant. La quantité de colorant fixé (indirectement de cellules fixées) est estimée par la mesure de l'absorbance à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Chromate, USA).

1. Appréciation de la qualité hygiénique

1.1. Boucherie N°1 (Aamriw)

Les lieux ont semblé avoir une bonne hygiène après avoir nettoyé (tôt le matin avant le service); le personnel (deux personnes) a été vêtu de tabliers (de couleur rouge), travaillant à mains nues et utilisant un hachoir et des ustensiles de découpe (couteaux, hache...) en acier inoxydable nettoyés, sur des tables en bois (fissurées) pour découper la viande et un support en acier inoxydable pour la déposer avant pesée et vente au client. La viande rouge a été conservée dans des réfrigérateurs ouverts sur le coté, en contact avec des herbes, tan dis que la volaille a été entreposée séparément dans un réfrigérateur fermé. La boucherie dispose d'une étroite chambre froide où est stockée la viande.

1.2. Boucherie N°2 (Quartier Sghir)

L'état des lieux a semblé avoir une mauvaise hygiène (fin de matinée, pendant le service), le personnel (deux personnes) a été vêtu de tabliers (de couleur rouge), encrassés de sang, travaillant à mains nues, la même personne passant du découpage à l'encaissement direct en utilisant des ustensiles (couteaux, hache, couperet...en acier inoxydable) et un hachoir (en acier inoxydable) non nettoyés sur des surfaces de découpe en bois et en acier inoxydable. La viande rouge, la volaille ainsi que les herbes ont été conservées dans le même réfrigérateur fermé. Cette boucherie ne dispose pas de chambre froide mais d'un congélateur où la viande rouge est entreposée.

1.3. Boucherie N°3 (centre ville)

L'état des lieux a semblé avoir une bonne hygiène (fin de matinée), le personnel sans blouse utilisant des ustensiles de découpe (hache, couteau de boucher, couperet...et divers couteaux en acier inoxydable) et un hachoir en acier inoxydable, encrassés de sang et de débris de viande. La découpe est effectuée sur une planche en bois fissurée contenant des débris. La viande rouge et la volaille ont été conservées séparément dans des réfrigérateurs. Aucune herbe n'a été observée. Cette boucherie dispose d'une chambre froide utilisée pour l'entreposage de la viande.

1.4. Marché populaire « EDIMCO »

Les prélèvements sont effectués chez trois vendeurs exposant leurs marchandises en plein air sur des tables recouvertes d'une nappe en plastique dans un environnement pollué (poussière, débris de viande, sang) avoisinant des stands de vêtements, légumes, articles ménagés ; les clients n'hésitant pas à toucher à la marchandise (bouzelouf, viande rouge, volaille). Les mêmes personnes (sans blouses ni gants) passent de la découpe et de la pesée à l'encaissement de l'argent.

Prélèvement N°1 : Bouzelouf

La viande (Bouzelouf) a été déposée sur une table recouverte de nylon blanc. Le vendeur semble avoir des boutons de fièvre (furoncles).

Prélèvement N°2 : Volaille

La viande de volaille a été entreposée dans des plateaux en plastique et en acier inoxydable ayant l'air propre. Le vendeur utilise divers ustensiles de découpe (divers couteaux, couperet...) en acier inoxydable.

Prélèvement N°3 : Viande rouge

La viande est entreposée sur une table recouverte de nylon et nettoyée à l'eau de javel, exposant de la viande rouge, en plein air. Le vendeur coupe la viande avec des ustensiles de découpe en acier inoxydable (divers couteaux, hache) sur une planche en bois.

2. Estimation de la qualité hygiénique

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (FTAM) au niveau des différentes boucheries et points de vente a permis le classement décroissant suivant: B2 ($5,28 \cdot 10^6$ UFC/ml), B1 ($2 \cdot 10^6$ UFC/ml), B4 ($1,12 \cdot 10^6$ UFC/ml), B3 ($5,2 \cdot 10^5$ UFC/ml) et B5 ($0,9 \cdot 10^5$ UFC/ml). Un classement également retrouvé lors du dénombrement des entérobactéries: B2 ($10,1 \cdot 10^5$ UFC/ml), B4 ($4 \cdot 10^5$ UFC/ml), B1 ($0,036 \cdot 10^5$ UFC/ml), B3 ($0,06 \cdot 10^5$ UFC/ml). Par contre, le dénombrement des coliformes fécaux (figure 1) n'a montré aucune présence de ce groupe bactérien au niveau des boucheries B1, B2 et B5 et une faible charge au niveau de B3 ($0,002 \cdot 10^5$ UFC/ml) et B4 ($0,07 \cdot 10^5$ UFC/ml) a été notée figure3. (annexe1, tableau I)

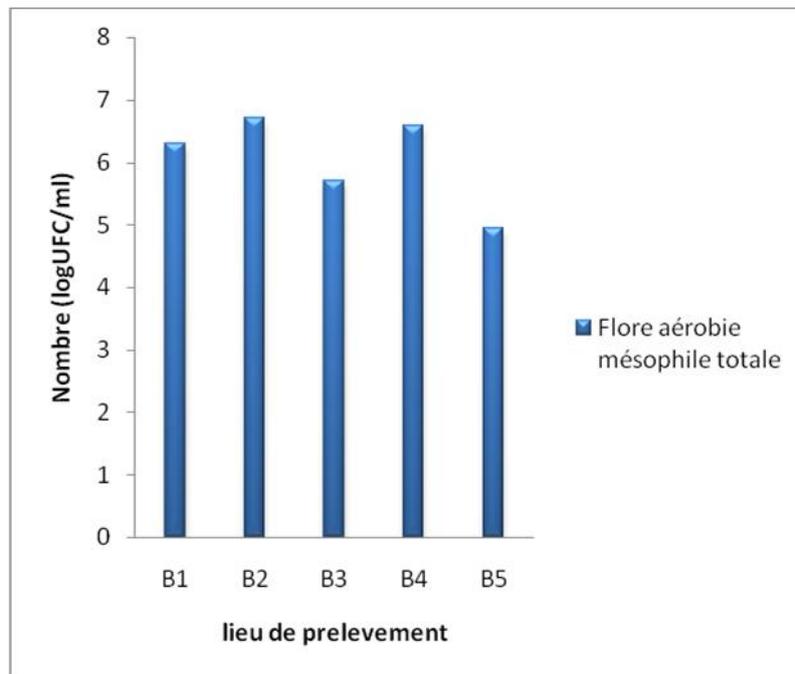


Figure 3 : Taux de la flore aérobie mésophile totale, au niveau des 3 boucheries (B1-B2-B3) et 2 points de vente (B4- B5) inspectés

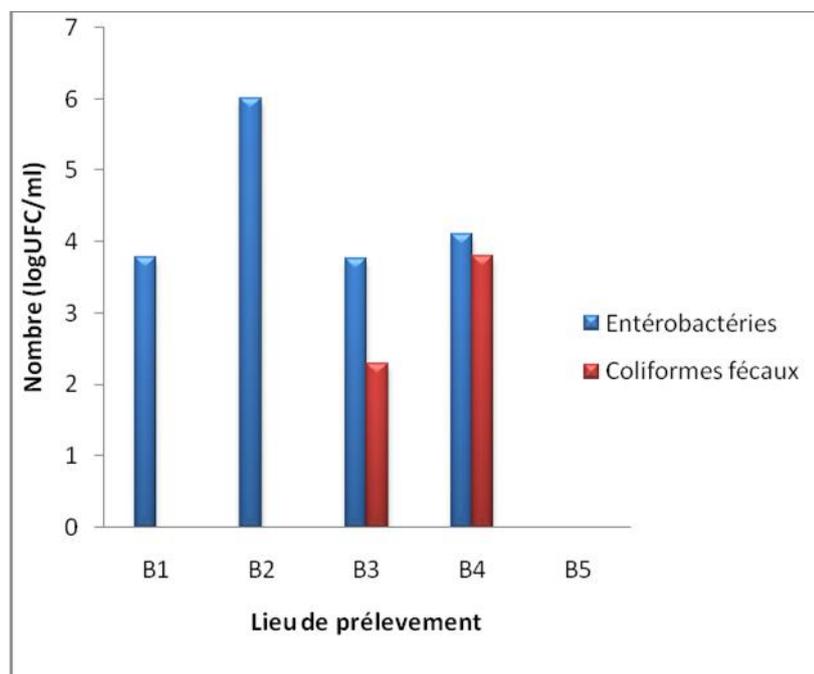


Figure 4 : Taux des entérobactéries et coliformes fécaux (*E. coli* présumé) au niveau des 3 boucheries (B1-B2-B3) et 2 points de vente (B4 et B5) inspectés

Les tests d'identification d'*E. coli* présomptifs (coloration de Gram, fermentation du lactose et production de H₂S, fermentation du Mannitol, mobilité, utilisation du citrate comme seule source de carbone, hydrolyse de l'urée et production d'indole) ont révélé que 5/5 (100%) des souches ayant montré un aspect caractéristique sur gélose VRBL à 44°C (violette à rose-rouge) fermentent le lactose, le glucose, le mannitol, n'utilisent pas le citrate comme source de carbone et sont toutes mobiles et productrices de gaz. Parmi les souches isolées (annexe 1, Tableau XII) de B3 et B4, 1/5 (25%) ont été uréase (+), indole (-) correspondant aux caractéristiques de *klebsiella*, les 4/5 (80%) restant ont été uréase (-) et indole (-) pouvant correspondre aux genres *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*. Il faudra pousser l'identification biochimique afin d'identifier l'espèce. Les résultats de notre étude sur l'estimation de l'hygiène des 3 boucheries et les 2 points de vente ont démontrés qu'il ya une charge très importante comparé au normes du (JORA, 1998) qui est de 20 UFC /ml, sachant que ces estimation sont basées sur des prélèvements effectués tôt le matin après nettoyage pour la boucherie 1 et un nettoyage sur place pour le point de vente B5 avec de l'eau de javel ce qui nous mène a conclure qu'en fin de journée l'hygiène des lieux serait inacceptable.

Concernant les coliformes fécaux (thérmotolérants), il ya Présence d'une faible charge (bonnes conditions d'hygiène) mais cela présente un risque dans le cas de formation de biofilms, leurs présences présument une contamination fécale récente et la présence de salmonelles, shigelles et même *E. coli* pathogènes (Zmirou et al., 1987)

2.1 Recherche et identifications

2.1.1 *Staphylococcus aureus*

Nous avons constaté lors de la recherche de cette espèce, en se basant sur l'aspect macroscopique sur milieu Chapman (annexe 1, tableau VII), que les surfaces A1 (hachoir), A2 (réfrigérateur), A3 (ustensiles), A4 (table en bois) et A5 (table en acier inox) ont été toutes contaminées au niveau des boucheries B1, B2 et B3. Par contre, au niveau des points de vente B4 et B5, cette espèce fut absente sur les surfaces A'2 (table recouverte de nylon) et A3 (ustensiles de découpe) dans le cas de B4 et sur les surfaces A'2 (table recouverte de nylon) et A4 (table en bois) dans le cas de B5.

Les tests d'identification (coloration de Gram, catalase, coagulase) nous ont confirmé l'identité de 18/59 souches présumées être *S. aureus* (annexe 1, tableau VII). Au niveau de la B1, la présence de *S. aureus* a été confirmée sur 4 surfaces (figure 5) à l'exception de la

surface A1 (hachoir). Par contre, sa présence au niveau de la boucherie B2 n'a été confirmée que sur les surfaces A3 (ustensiles de découpe) et A4 (table en bois) (Figure5). De même, au niveau de la boucherie B3 (figure 5), uniquement la surface A1 (hachoir) a été retrouvée contaminée. Concernant les deux points de vente (B4 et B5), les tests d'identification n'ont révélé aucune présence de *S. aureus* (figure 5).

En se basant sur l'ensemble des résultats de la recherche de *S. aureus*, 30,51% (18/59) des souches identifiées (annexe1, tableauVII) se sont révélées être *S. aureus*.

Les résultats de notre étude ont démontré que la prévalence totale de *S. aureus* trouvé est de 16%, similaire à celles trouvées au Maroc par (Senouci et *al.*, 2014) qui est de l'ordre de 16.66% sur les surfaces d'abattoirs, concernant la contamination des surfaces par *S.aureus* nos résultats ont démontré que A4 (Table en bois) et A3 (ustensiles de découpe) sont les plus contaminés,

La contamination par *S.aureus* pourrait être due à l'animal lui-même (bovin, volaille) et/ ou du manipulateur car elle appartient à la microflore normale de la peau, et des muqueuses par contamination directe ou bien croisée. L'environnement peut aussi être une source de contamination (Devriese,1980) .

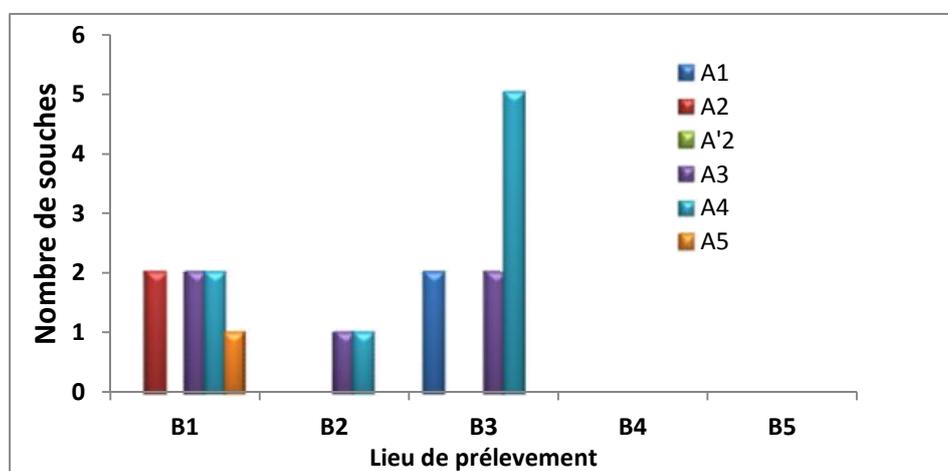


Figure 5. Nombre de souches de *S. aureus* identifiées sur les différentes surfaces

2.1.2. *Salmonella*

Nous avons constaté lors de la recherche de ce genre et en se basant sur l'aspect caractéristique sur milieu Hectoen (bleu vert et/ou a centre noir) que toutes les surfaces de la boucherie B1 sont indemnes de cette bactérie (annexe1, tableau II) contrairement à la B2 où toutes les surfaces semblent être contaminées (annexe1, tableau III). En revanche, la B3 n'a révélé de présence suspecte de salmonelles que sur la surface A1 (hachoir) (tableau IV ,annexe1). Concernant le point de vente B4, toutes les surfaces ont semblé être contaminées à l'exception de la surface A3 (table en bois) (annexe1 ,tableau V). Par contre seule cette dernière (A3) s'est révélée positive dans le cas de B5 (annexe1, tableau VI).

Les tests d'identification présomptifs de *Salmonella* (coloration de Gram, fermentation du lactose et production de H₂S, fermentation du Mannitol, mobilité, utilisation du citrate comme seule source de carbone, hydrolyse de l'urée et production d'indole) ont révélé que toutes les souches isolées sur Hektoen (9 souches) ont été mobiles et fermentent le mannitol, 9/9 des souches isolées des surfaces A2 (réfrigérateur), A5 (table en acier inox) de la boucherie B1 et A5, A1 ainsi que la surface A'2 (table recouverte de nylon) dans le cas de B4 ont été lactose/saccharose négatives et glucose positives uniquement 6/9 ont été H₂S positives.

Les 6/9 (66,66%) souches ayant montré les deux traits caractéristiques des salmonelles à savoir lactose (-) et H₂S (+) ont été isolées respectivement des surfaces A'2 et A5 (4 souches) de la B2, A4 de la boucherie B4 (1 souche) ainsi que la surface A5 de la boucherie B2 (annexe1 , tableau XI).

5/9 des souches prélevées sur les surfaces A2 et A3 (B2) et les surfaces A4 et A5 (B4) utilisent le citrate comme source de carbone.

Sachant que 2 /6 souches A2B2 identifiées sont H₂S (+), citrate (+) et productrices de gaz,on présume qu'elles appartiennent aux sérotypes suivants :*S.Typhimurium* ,*S.Enteritidis* ,*S.Pullorum* , tel qu'indiqué dans le tableau VI.

deux (2) souches isolées sur la surface A'2 du point de vente (B4) et la surface A5 de la boucherie B2 sont H₂S (+) citrate (-) et productrice de gaz apres identification donc on présume quelle appartiennent a l'espèce *S.Paratyphi B* , tel qu'indiqué dans le tableau VI.

Résultats et Discussion

Deux (2) souches isolées sur les surfaces A4 et A5 du point de vente (B4) est identifié comme étant H₂S (+) , citrate (-) et ne produit pas de gaz on présume qu'elles appartiennent à l'espèce *S.Gallinarum*

On remarque aussi que 5/9 des souches sont productrices de gaz dont 4 d'entre elles (4/5) sont également H₂S (+) (annexe1 ,tableau XI). 100% des souches sont mobiles et fermentent le mannitol.

3/9 souches sont H₂S(-) et cit(-) et productrice de gaz on présume que ces trois (3) souches appartiennent aux stéréotypes *S.Paratyphi A*

Tableau VI: Caractéristiques biochimique des différents stéréotypes identifier sur milieu TSI et citrate de Simmons.

	Pente	Culot		H ₂ S	Citrate
	Lactose / Saccharose	Glucose	Gaz		
<i>S.Typhimurium</i>	-	+	+	+	+
<i>S.Enteritidis</i>	-	+	+	+	+
<i>S.Pullorum</i>	-	+	+	+	+
<i>S.Paratyphi B</i>	-	+	+	+	-
<i>S.Gallinarum</i>	-	+	-	+	+
<i>S.Paratyphi A</i>	-	-	+	-	-

TSI : Triple Sugar Iron (+) =caractères positives (-) = caractères négatives

100 % des souches identifiées ne fermentent pas le lactose/Saccharose mais fermentent le glucose tandis que 54,55% des souches identifiées sont H₂S (+) et ne fermentent pas le lactose/Saccharose. Ces dernières répondent aux critères d'identification des salmonelles. Par contre, 45,45% des souches identifiées utilisent le citrate comme source de carbone. Pour salmonella on présume un totale de 5%, un taux inférieur à celui de l'étude faite en Chine par (Xu et al., 2013) qui est de 22 % trouvé sur les surfaces en contact avec la volaille

,selon nos résultats la surface la plus contaminée est la A5 acier inoxydable, effectivement dans l'étude de (Tando et *al.*, 2010) montre que l'acier inoxydable peut être contaminé par un taux Considérable. Sachant que *Salmonella* est la flore saprophyte du tube digestif ,et peut être présente dans l'organisme (porteur sain) (Yokoyama et *al.*, 1988), donc les germes du contenu digestif peuvent contaminer la surface des carcasses de façon indirecte (fèces souillant les cuirs) ou directe (fèces aux marges de l'anus ou perforation d'un réservoir digestif (éviscération) celles-ci peuvent donc contaminée les surfaces ainsi que d'autres carcasses par contaminations croisées ;toutes les souches sont potentiellement pathogènes pour l'homme porteur sain ou causant la salmonellose il s'agit d'une des plus importante cause d'intoxication alimentaire principalement lorsque la viande est consommé crus ou mal cuite.

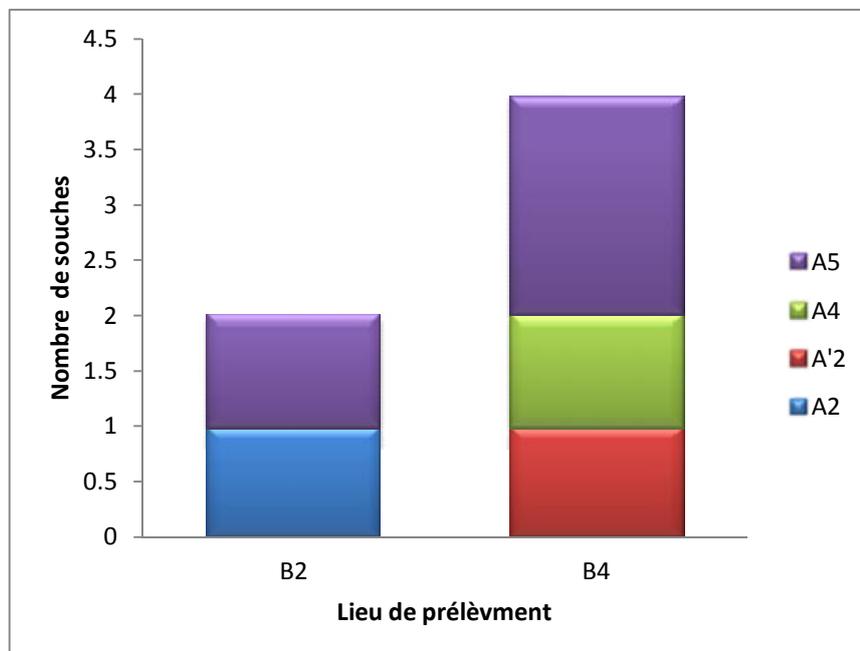


Figure 6. Nombre de souches de *Salmonella* isolées sur les différentes surfaces des boucheries B2 et B4

2.1.3. Entérocoques

Nous avons constaté lors de la recherche des entérocoques sur les différentes surfaces la présence de colonies caractéristiques sur gélose Slanezt-Bartley à l'exception de la surface A2 dans la boucherie B1, (annexe1, tableau II).

Les tests d'identification des entérocoques (coloration de Gram, croissance à pH=9,6, croissance en présence de 6,5 % (m/v) de NaCl, croissance à 44°C et thermo-résistance à 60°C/ 30 min) ont montré que 10/21 (42,86 %) des souches isolées répondent aux caractéristiques des entérocoques (annexe1,tableauVIII), dont 2 souches isolées sur les surfaces A4 (table en bois) et A3 (ustensiles de découpe) de la boucherie B1. Dans la boucherie B2, seule la surface A1 (hachoir) s'est révélée positive. De même, les surfaces A1 et A4 (B3) et A'2, A3, A4 et A5 (B4) elles se sont toutes révélées contaminées (figure 4) contrairement au dernier point de vente B5 où seule la surface A3 fut contaminée (figure 7).

Un taux de 15% d'entérocoques est enregistré dans notre étude, selon (Franz et *al.*, 2004) les entérocoques contaminent largement les viandes ,pour ce qui est des surface on remarque que leurs présences est partout selon l'étude (Compos al,2012) les entérocoques ont la capacité de s'adapter aux conditions les plus hostile

La contamination peut être d'origine animal ou humaine car ils sont plutôt typiques des déjections animales (Clausen, 1977 ; Farrow ,1984 et Bitton, 1999) se trouvant dans le tractus intestinal des animaux (Compos et *al.*, 2012). Ces espèces colonisent le bétail, les chevaux et la volaille bien qu'elles peuvent parfois être présentes chez l'humain, (Ruoff, 1989;Devriese,1998) ce sont des marqueurs de contamination fécale (Briand, 2007).

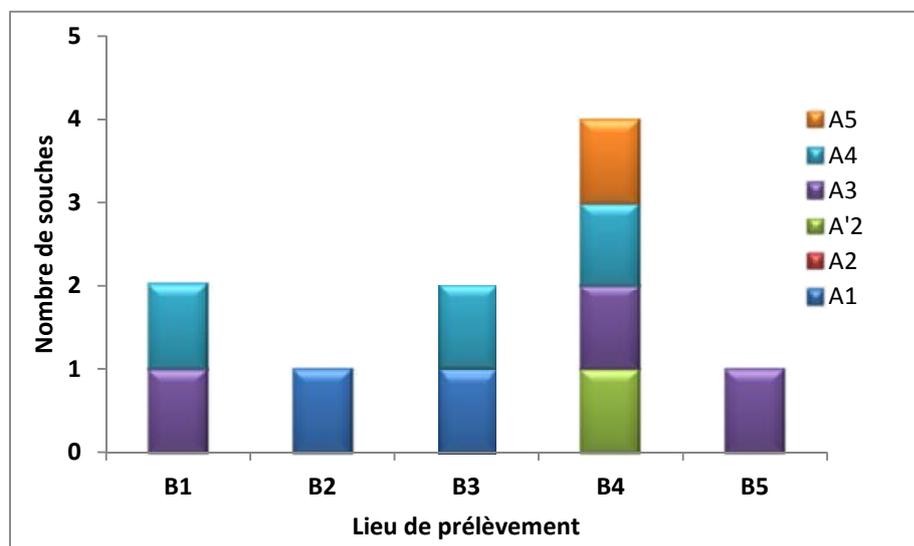


Figure 7. Nombre de souches d'entérocoques isolées des différentes surfaces

2.1.4. Bactéries lactiques

La recherche de ces bactéries (annexe1) a montré la présence de colonies caractéristiques (rondes, crémeuses...) sur les géloses MRS (pH=5,5) et M17 (pH 6,5) et ce à partir des prélèvements effectués sur toutes les surfaces des 3 boucheries (B1, B2 et B3) et des 2 points de vente (B4 et B5).

Les tests d'identification (coloration de Gram et catalase) de 30 souches isolées des boucheries B1 et B2 ont montré que 21/30 (70%) sont des bacilles et 9/30 (30%) sont des coques (figure 5).

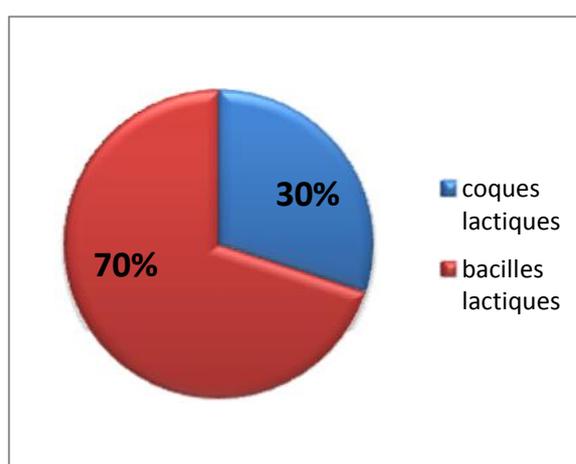


Figure8 : Nombre (%) de coques et de bacilles lactiques isolés des boucheries B1 et B2

Les tests d'identification des bacilles présumés être des lactobacilles (production de gaz à partir de glucose, croissance à 45°C) ont montré que 8/21 (38,1%) des souches, isolées des boucheries B1 et B2, sont thermophiles et hétéro-fermentaires ils appartiennent au sous-groupe « *Betabacterium* » dont 5 prélevées des surfaces A1, A2, A3 et A4 (B1) et 3 souches prélevées des surfaces A2, A4 et A5 (B2) (figures 5 et 6; tableau , annexe). Par contre, 12/21 (57,14%) des souches, isolées de B1 et B2, se sont révélées être des thermophiles homo-fermentaires appartiennent au groupe « *Thermobacterium* » dont 4 souches prélevées de la surface (A1) et le reste prélevées de la boucherie B2 à partir des 4 surfaces inspectées. Une seule souche (1/21) représentant 4,77% isolée de la surface A3 (B2), s'est révélée être mésophile homo-fermentaire elle appartient au groupe « *Streptobacterium* » ces groupes du genre *Bacillus* ont été subdivisés par Orla-jensen (Guiraud et Rosec., 2004) (figures 9 et 10).

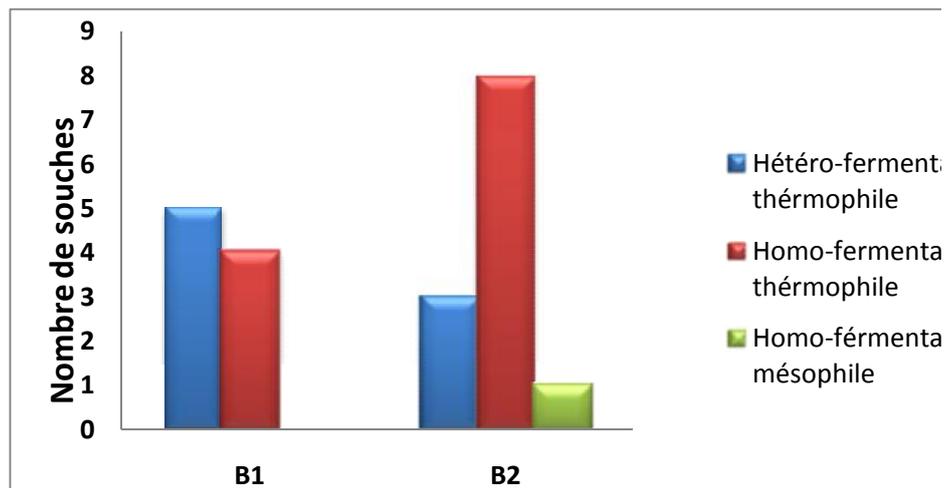


Figure 9. Nombre de souches de bacilles lactiques, classés en groupes, isolées des deux boucheries B1 et B2

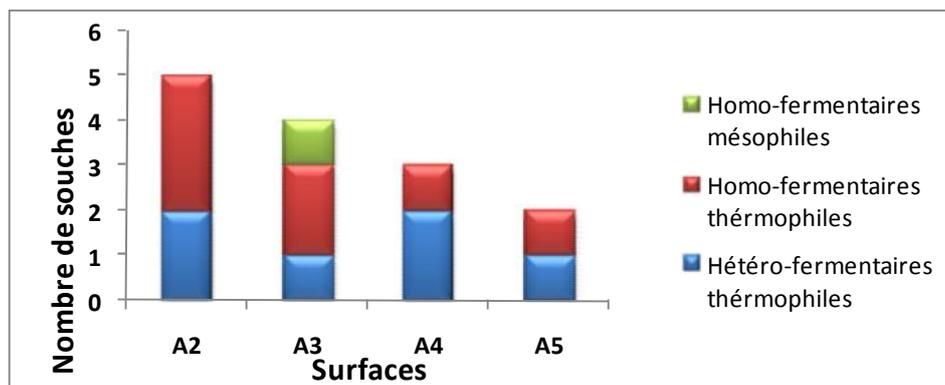


Figure 10. Nombre de souches de bacilles lactiques, classées en groupes, isolées des différentes surfaces des boucheries B1 et B2

L'identification des coques lactiques a montré que 4/9 (44,44%) des souches isolées de la boucherie B1 se sont révélées être des entérocoques, tandis que 5/9 (55,55%) des souches sont autres dont 2 souches de lactocoques (halotolérantes [6,5 % NaCl] prélevées de la surface A1 (B1 et B2) et 2 souches (A4 et A5), halotolérantes et poussant à pH 9,6 et à 44°C, la dernière souche isolée de la boucherie B1 (A2) fut halotolérante et poussant à pH 9,6. Ces dernières peuvent appartenir au genre *Lactococcus*, (figure11).

Concernant les bactéries lactique autres que les entérocoques notre étude a démontré un taux de 64% et on les retrouve sur toutes les surfaces, Dans la plupart des cas, la détérioration par les bactéries lactiques provient de la ligne de production ou dans les matières premières (viande ,volaille) et sont résistantes aux stress environnementaux d'après (Senda et

al.,2008)ce qui explique leurs taux élevés et leurs propagations, sachant que les bactéries lactiques se trouvent dans différentes niches écologiques : lait, les végétaux, la viande, les muqueuses humaines , animales et dans le tractus digestif elles sont aussi retrouvées dans le sol, les engrais, et les eaux d'éégout (*Holzapfel et al.*, 1996) ce qui nous mènent à dire qu'il existe divers sources de contamination directes ou croisées au sein des boucheries.

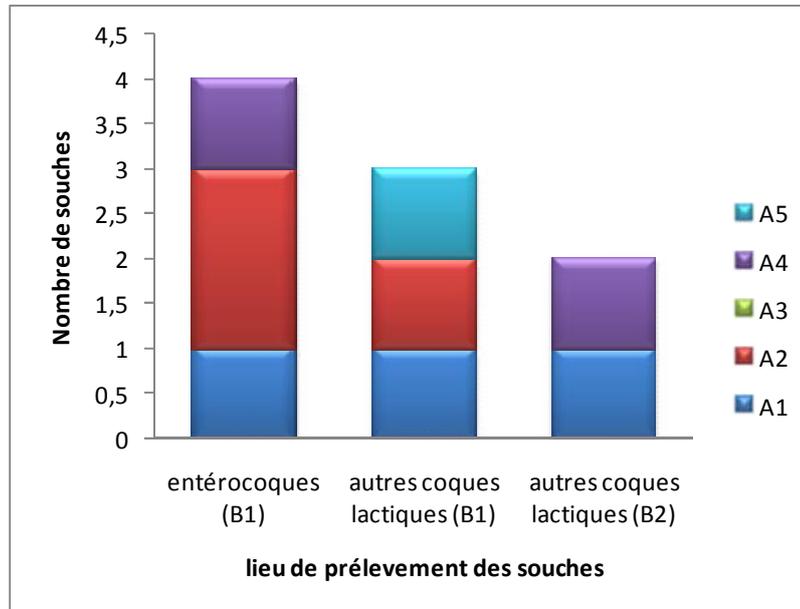


Figure 11 : nombre de souche d'entérocoques et autres coques lactiques isolées des différentes surfaces des boucheries B1 et B2.

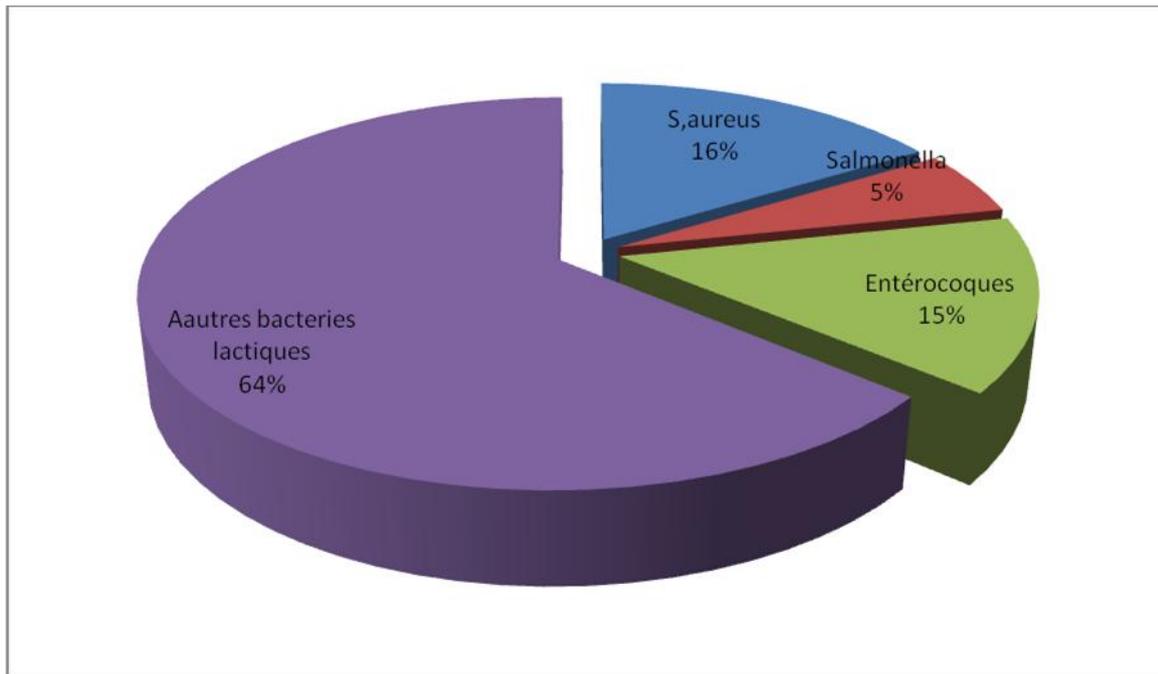


Figure 12: Taux de bactéries recherchées sur l'ensemble des échantillons (B1-B2 -B3,-B4 - B5)

3. Capacités d'adhésion des souches identifiées

L'adhésion et la formation d'un biofilm est détectée visuellement au niveau des puits des microplaques tel que montré sur la figure .toute fois l'importance de cette adhésion ne peut être estimé que par la mesure des absorbances après coloration au cristal violet

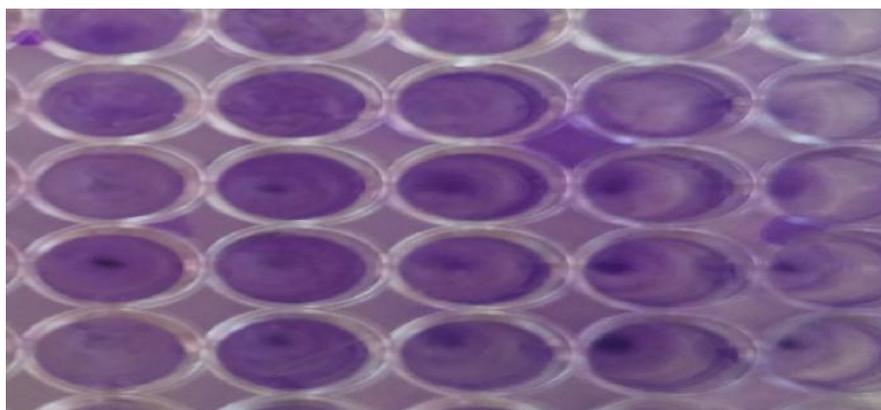


Figure 13 : Photographie de biofilms dans des puits de microplaque en polystyrène de 96 puits ,après coloration au cristal violet (photo original).

3.1. Souches pathogènes (*Salmonella* , entérocoques)

les mesures d'absorbance (A) a 540nm des suspensions bactériennes correspondants aux 6 souches de *Salmonella* et 10 souches d'entérocoques utilisés dans cette étude obtenue après coloration au cristal violet ont donné des valeurs comprises entre 0.35 et 0.502 ; 0.268 et

0,97 respectivement. (Figure 14) on remarque un rapprochement dans les moyennes d'absorbance des différentes souches de *Salmonella* ce qui indique que leurs capacités d'adhésion est proche sans dis que pour les entérocoques leurs différences dans les moyennes d'absorbance indiquent une différence dans la capacité d'adhésion

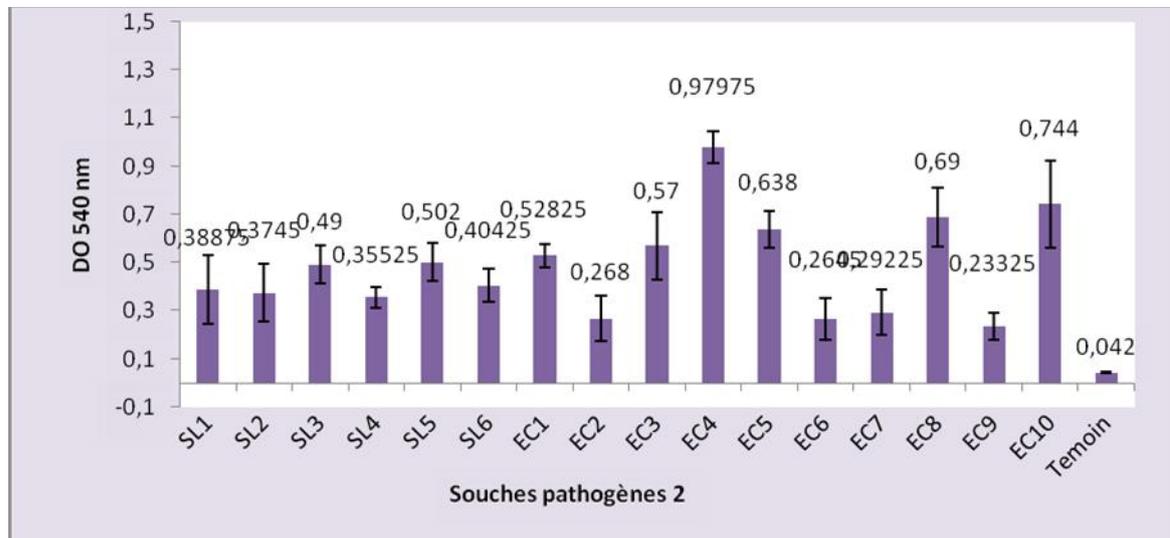


Figure 14 : les moyennes des capacités d'adhésion des 6 souches de *Salmonella* (SL1/SL6) et 10 souches des entérocoques (EC1 /EC10) sur les différentes surfaces de boucheries et points de vente.

Tableau VII : Estimations des résultats d'adhésion de *Salmonella*

Souches	Absorbances	Potentiels d'adhésions
SL1 (B4A5S1) SL2 (B4A3S2) SL3 (B4A5S1) SL4 (B4A'2S1) SL5 (B4A4S1) SL6 (B2A5S1)	$0.64 \leq A \leq 0.32$	Très adhérente

3.1.1. *Salmonella*

100% de nos souches sont très adhérentes sachant que la surface la plus contaminée est en acier inoxydable.

Bien que cette surface est recommandée (ne favorise pas la contamination et l'adhésion) d'après l'étude de (Chen et al., 2013) on suppose que cette dernière est usée

(création de crevasses) en plus de leurs pouvoirs d'adhésion grâce aux composants structurales importants (curli ,fimbriae ...) ,sachant que salmonella résiste même à la dessiccation et la désinfection (vanderleyden , 2012).

3.1.2. Entérocoques

Les entérocoques adhèrent sur toutes les surfaces fortement ou moyennement comme le démontre (Seneviratne *et al* ;2013) on constate dans notre étude le même résultat sur les différentes surfaces des boucheries.

Tableau VIII : Estimations des résultats d'adhésion des entérocoques

Souches	Adhésions	Absorbances	Potentiels d'adhésion
EC1 (B5A3) EC5 (B1A3) EC3 (B4A3)		0.64<A0.32	Très adhérente
EC2 (B4A5) EC6 (B4A'2) EC7 (B2A1) EC9 (B3A4)		0.31<A<0.16	Moyennement adhérente
EC4 (B3A1) EC8 (B4A4) EC10 (B1A4)		0.64<A	Fortement adhérente

3.1.3. *S.aureus*

les mesures d'absorbance (A) a 540nm des suspensions bactériennes correspondants a 16 souches de *S.aureus* utilisés dans cette étude obtenue après coloration au cristal violet ont donné des valeurs comprises entre 0.109 et 0.349 (Figure14) on remarque un rapprochement dans les moyennes d'absorbance de la plus part des souches de *S.aureus* mis a part 2 souches ce qui indique que leurs capacités d'adhésion est plus au moins proche concernant 14 souches

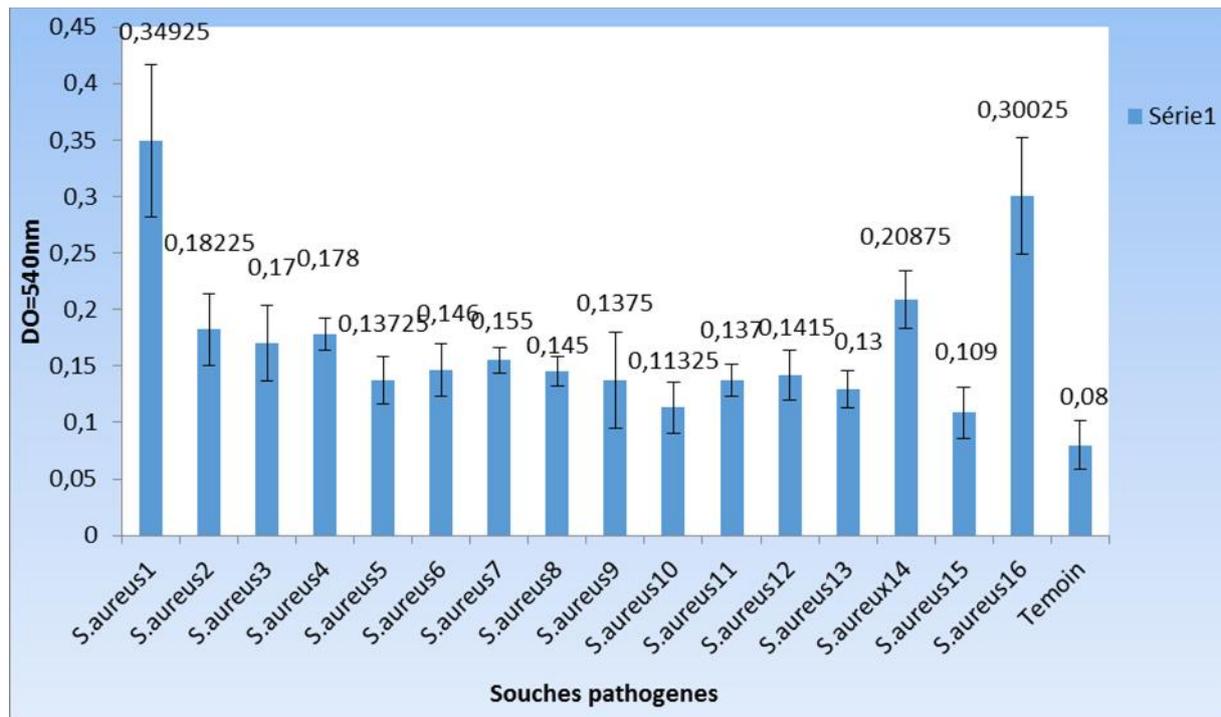


Figure 15 : les moyennes des capacités d'adhésions de 16 souches de *S.aureus* sur les différentes surfaces de boucheries et points de vente.

Tableau IX: les estimations des résultats d'adhésion des *S.aureus*

Souches Adhésions	Absorbance	Potentiels d'adhésion
<i>S.aureus1</i> (B2A4S1)	0.320<A	Très adhérente
<i>S.aureus2</i> (B3A2S4) <i>S.aureus3</i> (B3A3S5) <i>S.aureus4</i> (B1A4S4) <i>S.aureus14</i> (B2A5S2)	0.320<A<0.160	Moyennement adhérente
<i>S.aureus5</i> (A3B3S2) <i>S.aureus6</i> (B3A4S5) <i>S.aureus7</i> (A2B3S1) <i>S.aureus8</i> (B3A2S2) <i>S.aureus9</i> (B1A5S3) <i>S.aureus10</i> (B1A2S1) <i>S.aureus11</i> (B1A3S2) <i>S.aureus12</i> (B1A1S4) <i>S.aureus13</i> (B1A2S5) <i>S.aureus15</i> (B1A3S1) <i>S.aureus16</i> (B1A5S4)	0.160<A<0.080	Faiblement adhérentes

62,16% des *S.aureus* sont faiblement adhérente comprend toutes les surfaces , 6,25% sont fortement adhérente se retrouvent sur les ustensiles de découpes (acier inoxydable) même si d'après (Chen et *al.*, 2013) l'acier inoxydable ne favorisent pas la formation des biofilms mais celles-ci lorsqu'elles sont usées il ya création de crevasses la surface deviens rugueuse et donc la surface de contact est plus disponible (Donlan, 2000) ,25% sont moyennement adhérentes sur les surfaces en bois d'après l'étude de (Carpentier, 1997) le bois étant une surface poreuse et absorbant l'eau ce qui favorise sa contamination et la formation des biofilms ,la propriété invasive et adhésive des *s.aureus* contribue à leurs formation de biofilm ainsi qu'à leurs résistances à la phagocytose (Projan et Novick, 1997) ce qui constituent un risque majeur sur la santé publique en produisant une toxine qui s'accumule dans l'aliment et elle pourrait être responsable d'une intoxication. Cette toxine étant thermostable, il est important de noter que la cuisson de l'aliment, si elle peut tuer la bactérie, ne permet pas sa destruction (Bailey et *al.*,2012)

3.2. Souches lactique

les mesures d'absorbance (A) a 540nm des suspensions bactériennes correspondants a 30 souches de bactéries lactique dont 9 souches sont des coques lactiques

(S7,S5,S3,S27,S30,S22 ,S11,S15,S26) et 11 pour les lactiques

(S1,S2,S4,S6,S8,S9,S10,S12,S13,S14,S16,S17 ,S18 ,S19,S20,S21,S23,S24 ,S25,S28,S29)

les bacilles lactiques utilisées dans cette étude obtenue après coloration au cristal violet ont donné des valeurs comprises entre 0.15 et 0.32 , 0.13 et 0.58 respectivement ; on remarque un rapprochement dans les moyennes d'absorbance entre les différentes souches de coques lactiques ce qui indique que leurs capacités d'adhésion est proche mais on remarque que pour les lactobacilles les moyennes d'adhésions des souches sont différentes ce qui indique une différence dans leurs capacités d'adhésions.(Figure16)

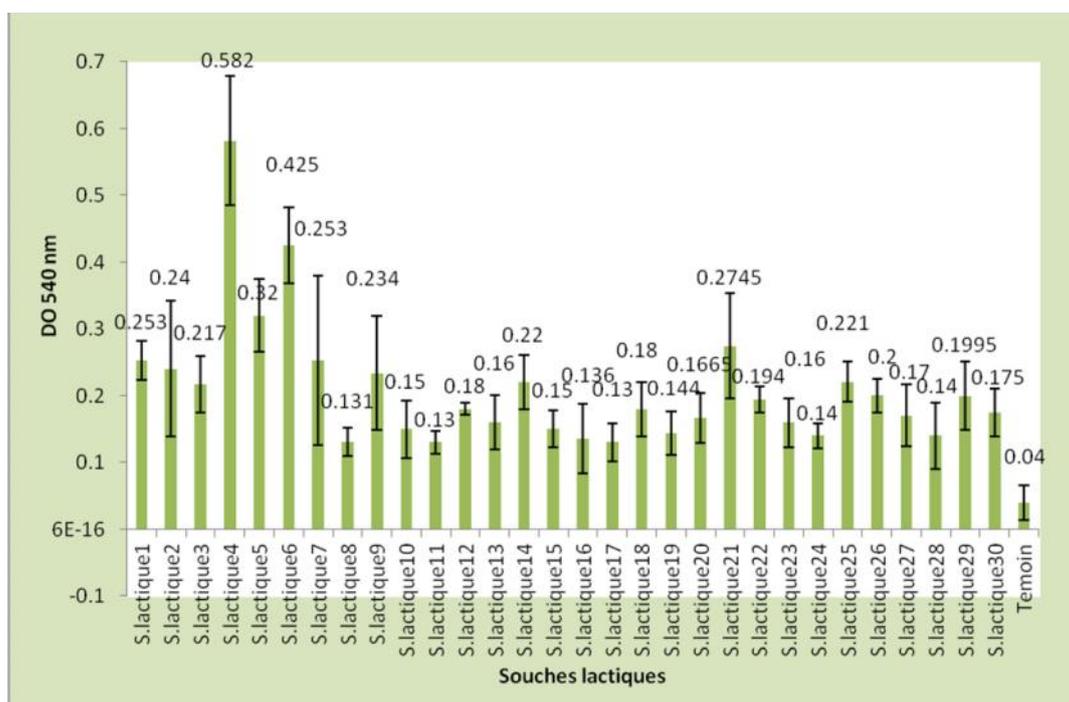


Figure16 : les moyennes des capacités d'adhésions de 30 souches de bactéries lactique prélevées sur les différentes surface des 2 boucheries B1 et B2

Tableau X : les estimations des résultats d'adhésion des bactéries lactique

Souches Adhésion	Absorbances	Potentiels d'adhésion
S.lactique1 (B2A3 S1) S.lactique2 (B2A2 S1) S.lactique3 (B2A1 S1) S.lactique9 (B1A1 S2) S.lactique10 (B1A3) S.lactique14 (B2A2 S3) S.lactique18 (B2A3 S3) S.lactique20 (B1A1 S3) S.lactique21 (B2A4 S1) S.lactique22 (B2A4 S2) S.lactique25 (B1A1 S5) S.lactique26 (B1A1 S6) S.lactique27 (B1A5 S1) S.lactique29 (B1A1 S8) S.lactique30 (B1A5S2)	$0.160 \leq A \leq 0.320$	Trés adhérente
S.lactique4 (B1A1 S1) S.lactique6 (B2 A3 S2)	$320 \leq A$	Fortement adhérente
S.lactique5 (B1A2 S1) Slactique7 (B1A4 S1)	$0.040 < A < 0.080$	Faiblement adhérentes
S.lactique8 (B2A1 S2) S.lactique11 (B1A2 S2) S.lactique13 (B2 A2 S2) S.lactique15 (B1A2 S3) S.lactique16 (B2A1 S3) S.lactique17 (B1A4 S2) S.lactique19 (B2 A5) S.lactique23(B1A1 S4) S.lactique24 (B2A2) S.lactique28 (B1A1 S7)	$0.080 \leq A \leq 0.160$	Moyennement adhérente

concernant la capacité d'adhésion des souches de bactéries lactique appartenant aux différents genres a révélé qu'elles étaient capables d'adhérées moyennement ou fortement comme le démontre (kubota et *al.* , 2008) ; dans notre étude les bactéries lactiques adhèrent sur toutes les surfaces des boucheries mais plus fréquemment sur le hachoir (A1) cela est peut

être due aux surfaces inaccessibles pour le nettoyage ainsi que sa structure (pores, tuyauterie...) qui constitue une niche pour les bactéries lactiques

4. Comparaison du Potentiel d'adhésion des souches lactiques et des souches pathogènes

Par comparaison aux souches lactiques nous constatons que les souches pathogènes adhèrent mieux aux polystyrène ce si seraient la conséquence d'une différence pour la composition de l'enveloppe cellulaire en effet il a été bien établi que l'adhésion bactérienne aux surfaces abiotique fait intervenir plusieurs molécules de la surface cellulaire dont les flagelles, curli comme le démontre l'étude de (vanderleyden ,2012)

Conclusion

Dans cette étude l'estimation de l'état d'hygiène a montré qu'il varie entre les trois boucheries et les deux points de vente avec un taux considérable en flore totale et présence de bactéries pathogènes sur l'ensemble des prélèvements de surface. En effet, *Salmonella* a été identifiée dans deux boucheries, *S. aureus* dans la majorité des boucheries tandis que les entérocoques et les bactéries lactiques ont été omniprésents dans toutes les boucheries et points de vente, contrairement aux coliformes fécaux (thermotolérants) dont la charge reste faible.

Les souches isolées (pathogènes et lactiques) ont été trouvées toutes capables d'adhérer soit moyennement, fortement ou faiblement dans la microplaque en polystyrène avec un potentiel plus élevé chez les souches pathogènes.

Toutes les surfaces de travail et de matériel en contact avec la viande sont susceptibles d'être contaminées par les micro-organismes; cette microflore ne peut être réduite que si les bonnes pratiques d'hygiène soient strictement respectées au cours des manipulations. Pour cela, des mesures préventives sur toute la chaîne de manutention, depuis l'abattage jusqu'à l'arrivée au point de vente doivent être imposées. La viande ne doit pas être chargée en micro-organismes au moment de la livraison car leur nombre peut s'accroître par la suite et peut être des taux considérables ; cette multiplication peut être inhibée par une conservation de celle-ci à des températures défavorables au développement microbien. De même, des conditions d'hygiène doivent être maintenues sur le lieu de vente qui doit être équipé d'un dispositif d'aération, les murs et les surfaces de travail doivent être lisses et nettoyées fréquemment durant la journée. Les ustensiles utilisés représentent également une source potentielle de contamination car tout ces outils peuvent servir de vecteurs de microorganismes entre les éléments souillés et l'aliment, c'est pour cela qu'ils doivent être nettoyés régulièrement en utilisant des désinfectants comme l'acide hypochloreux (CLOH, eau de Javel) qui est mondialement reconnu pour son effet oxydant à action bactéricide. Toutefois, les produits de nettoyage dont ce dernier peuvent causer une corrosion des matériaux, par conséquent un renouvellement du matériel est préférable afin d'éviter de créer des abris (fissures, crevasse, partie creuse) aux microorganismes qui sont difficiles à nettoyer et à désinfecter.

Les contaminations lors des manipulations sont inévitables, cependant il est possible de les limiter en adoptant certaines pratiques de travail et cela en évitant les contaminations croisées, en respectant le principe de la marche en avant c'est-à-dire qu'il faut définir des fiches de postes en tenant compte du facteur contamination bactérienne de façon à optimiser le travail tout en réduisant le risque bactérien (exemples : jeu de 2 couteaux un pour les opérations sales et un pour les propres, principe de la main propre et de la main sale).

Le personnel est le maillon majeur et le plus fragile de la maîtrise de l'hygiène, en effet c'est lui qui réalise le contrôle des matières premières, qui nettoie le matériel et les locaux et qui respecte les consignes de travail. Pour éviter des contaminations par le fait des opérateurs, il faudra que ceux-ci soient qualifiés, formés, sensibilisés et impliqués dans le respect de l'hygiène.

De la fin de la chaîne d'abattage à la vente, passant par le transport et la conservation puis à la cuisson des viandes, l'hygiène de la manipulation en général est nécessaire pour maîtriser le développement bactériens afin d'éviter au maximum tout risque d'exposition aux toxi-infections alimentaires.

Références bibliographiques

- Bailley.Brugere H et Chardon H.(2012).Micro-organismes et parasites des viandes :les connaitre pour les maitriser,de l'éleveur au consommateur.Centre d'information des viandes.Centre d'information des viandes(paris).p9
- Bailey R., Williams S, Henderson P, Wareing DR., Bolton FJ, FROST JA , Ward L, Humphrey TJ. (2002). Prevalence and numbers of Salmonella and Campylobacter spp on raw whole chickens in relation to sampling methods. International journal food of microbial . **76**,151-164.
- Bellon-Fontaine Mn et Cerf O.(1991).Mechanisms of microorganisms adhesion to surfaces : factors influencing the adhesion.Journal des industries alimentaires et agricoles.**108**,13-17.
- Biswas AK, Kondaiah N, Anjaneyulu ASR et Mandal PK. 2011. Causes, concerns, consequences and control of microbial contaminants in Meat. International journal of Meat Science.**1**, 27.35.
- Bitton, G,Wiley J et Sons.B (1999).Wastewater Microbiology. International Journal of Innovation and Applied Studies.**6** ,578 p.
- Bonnefoy C, Guillet F, Leyral G et Vernes- Bourdais E. (2002). Population contaminant altérant la qualité sanitaire et marchande in Microbiologie et Qualité dans les Industries Agroalimentaires. Collection Biosciences et Techniques .Sciences des Aliments. 248p.
- Bourgeois CM, Mescle JF et Zucca J. (1996). La microflore de la viande (336-345). In Microbiologie Alimentaire: Aspect Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité des Aliments. Lavoisier Tec et Doc: Paris; 672 p.
- Briand P.(2007). Avis de l'Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments relatif à la demande de création de documents de référence concernant des flores microbiennes utilisables en tant qu'indicateur d'hygiène des procédés. Agence française de Sécurité sanitaire des Aliments : Paris,9 p.
- Campos D, Destain J, Dauphin RB et Aguilar-Galvez A.(2012).les entérocoques : avantage et inconvénients en biotechnologie.Biotechnol agron soc environ.**16**,67-76.
- Carpentier B et Cerf O.(1993).Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. Journal of applied bacteriology.**75**,499-511.
- Carpentier B ,(1997).Sanitary quality of meat chopping board surface.Food microbiology.**14**,31-37.

- Carpentier, B., Cerf O. (2011). Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiol.*145, 1–8.
- Cartier P. 2004. Points de repères en matière de qualité microbiologique viandes bovines. Collection Interbev ; 179p. Cavalli S. 2003. Application de la méthode HACCP en établissement d'abattage : modèles théoriques et essai de mise en place. Thèse de Médecine Vétérinaire, ENVL, Lyon, 132p.
- Clausen, EM, Green BL et Litsky W.(1977). Fecal streptococci: indicators of pollution, bacterial Indicators/Health hazards associated with water. *American Society for Testing and Materials.* **635**, 247-264.
- Clutterbuck AL, Woods EJ, Knottenbelt DC , Clegg PD, Cochane CA, Percival SL.(2007). Biofilm and their relevance to veterinary medicine. *Veterinary microbiology.* **121**, 1-17.
- Coibion L. 2008. Acquisition des qualités organoleptiques de la viande bovine: adaptation à la demande du consommateur. Mémoire pour l'obtention du grade de Docteur Vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 97p
- Corry TEL.(2007). Spoilage organisms of red meat and poultry (101-122). In *Microbiological Analysis of Red Meat, Poultry and Eggs*, Mead GC Editions Woodhead publishing limited and CRC press LLC. Cambridge, England; 348p
- Costerton JW, Geesey GG et Cheng KJ.(1978). How bacteria stick. *Scientific American.* **238**, 299-324.
- Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ.(1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual review of microbiology.* **35**, 299-324
- Costerton JW.(1995). Overview of microbial. Biofilms. *Journal of antimicrobial.* **15**, 137-140.
- Costerton JW.(1999) . Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents.* **11**, 271-221.
- Denis O, Evonne MM , Matthew PM , Martins M , Fanninh et S, Duffy G.(2015). Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *International journal of food microbiology.* **206**, 7-16.
- Dennai N, Kharrattib B et El Yachiouim A.(2001). Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. *Annales de médecine vétérinaire.*, **145**, 270-274.

- Devey ME. (2003).Rhamnolipid surfactant production effects biofilm architecture in *Pseudomonas aerogenosa* PAOI.Journal of bacteriology.185.1027-1036.
- Devriese LA. (1980). Pathogenic staphylococci in poultry. World's poultry science journal. **36**, 227-236.
- Devriese .(1998).Differentiation between *Streptococcus* gallolyticus strains of human clinical and veterinary origin and Streptococcus of ruminants.journal of clinical microbiology.**38**,3520-3523.
- Donlon RM.(2000).Biofilms and device-associated infections.Emerging infectious diseases.**7**,277-281.
- Dreeszen PH.(2003).The key to understanding and controlling bacterial growth in automated drinking water systems.ED.Edstrom industries inc.
http://www.edstrom.comLDocLib/4230-DS3_100Complete_biofilm.pdf. (accessed 2.05.14).
- Eslava C, Villaseca J, Hhrnandez U, Cravioto A.(2003). *Escherichia coli*, In : Miliotis M.D., Bier J.W. (Ed.), International handbook of food borne pathogens. Marcel Dekker ,p 123-135.
- Farrow, J.A.E.(1984).Taxonomic studies of *S. bovis* and *S. equinus* : description of *S. alactolyticus* and *S. saccharolyticus*.Systematic and Applied Microbiology.**5**,467-482.
- Filloux A et Vallet I.(2003).Biofilm :mise en place et organisation d'une communauté bactérienne.Médecine/Science.**19**,77-83.
- Franz C et Holzapfel W. (2004). The genus Enterococcus: biotechnological and safety issues. In: Salminen S., Von Wright A. & Ouwehand A., eds. Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 199-248.
- Ganesh K.C et Anand S.K.(1998).Significance of microbial biofilms in food industry.International journal of food microbiology.42,9-27.
- Ghfir Yet Daube G.(2007).Le point sur les methods de surveillance de la contamination microbienne des d'entrées alimentaires d'origine animal.annales de medicine vétérinaire.**151**,79-100.
- Giaouris E, Heir E , Hébraud M , Chorianopoulos N , Langsrud S,Moretro T , Habimana T , Desvaux M , Renier S et George(2015). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods.Meat science.**97**,298-309.

- Gladel J.(1978). Données épidémiologiques relatives aux toxi-infections alimentaires à *Salmonella* .Medecine et maladies infectieuses.**5**,250-261.
- Guiraud JP. (2003). Microbiologie Alimentaire. Edition : Dunod. Paris.258p,283p,285p,291p,343p,351p,354p,355p,356p,357p,358p.
- Guiraud JP et Rosec JP.(2004).Pratique de norms en microbiologie alimentaires.Edition:Afnor.Paris.251p
- Habimana O, Møretrø T, Langsrud S, Vestby LK , Nesse LL et Heir H .(2010). Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. BMC Veterinary research.**6**.1746-6148.
- Hermans K et Mostafa Nemati¹, Luc A. Devriese, Dominiek Maes³ and Freddy Haesebrouck¹ 2009 Screening of genes encoding adhesion factors and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from poultry Avian Pathology.Avian pathology. **38**(6), 513-517.
- Holzapfel W.H, Haberer P., Geinsen R., Bjorkloth J. et Schilling U.(2001).Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition .American journal of clinical nutrition.**73**,365 - 373.
- Irie Y et Parsek MR.(2008).Quorum sensing and microbial biofilms.Current topics in microbiology and immunology.**322**,67-84
- Kubotaa H ,Sendaa S,Nomurab N,Tokudaa N et Uchiyamab.(2008). Cover image Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress.Journal of Bioscience and Bioengineering.**106**, 381–386.
- Kodjikian L et Burillon C.(2003).Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the ica locus: a scanning electron microscopy study.Investigation ophthalmology and visual science.**10**,4382-4387.
- Larpent JP. (1997) .Microbiologie alimentaire : Techniques de laboratoire. Edition : Lavoisier.Paris.270p.
- Lawrie RA et Ledward DA.(2006). The spoilage of meat by infecting organism (157- 188). In Lawrie's Meat Science (7th edition). Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Cambridge CB1 6AH: England, Abington; 442p.
- Lazar V .(2011).Quorum sensing in biofilms – how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power.Anaerobe.**17**,280-285.
- Liu L, Tan, S, Jun, W, Smith, A., Meng, J, et Bhagwat, A. A. (2009). Osmoregulated periplasmic glucans are needed for competitive growth and biofilm formation by *Salmonella*

enterica serovar Typhimurium in leafy-green vegetable wash waters and colonization in mice. *FEMS Microbiology Letters*.**1**, 13–20.

- Mack D.(1999).Molecular mechanism of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation.*Journal of hospital infections*.**43**,113-125.
- Mckenney D et Hubner J.(1998).The ica locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide/adhesion. *Infection and immunity*.**66**,4711-4720.
- Mead PS., SLUTSKER L , Dietz V, MC caig L.F, Bresee JS., Shapiro C, Griffin PM et Tauxe RV.(1999).Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infection deiseases*. **5**, 607- 625.
- Mintz et Du Bois.(2002). The anthropology of food and eating. *Annual Review of Anthropology*, **31**.99–119.
- Morar, Sala C, Adrian I, Colibar O, Attila et Morvay A .(2012). Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surface biofilm. *Romanian Biotechnological Letters*.**4**, 6888-7438.
- O'Tool GA ,Pratt LA , Warnick PI Neuman , Neuman DK,Weaver VB ,Koeter R.(1999).Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology*.**310**,91-109.
- Padungdot P., Hanson R, Wilson DL , Bell J, Linz JE et Kannene JB. Identification of *Campylobacter jejuni* isolates from cloacal and carcass swabs of chickens in Thailand by a 5' nuclease fluorogenic polymerase chain reaction assay. *Journal of food protection.*, **65**, 1712-1716.
- Projan, SJ et Novick RP. (1997). The molecular basis of pathogenicity. In K.B. Crossley & G.L. Edition: Archer .New York.. 81 p.
- Salifou CFA, Boko KC , Ahounou GS , Tougan PU ,Kassa SK ,Houaga I , Farougou S , Mensah GA , Clinquart L et Youssao AKI.(2013). Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs.*International journal of biology and chemical sciences*.**7**,1351-1369.
- Senouci S, Sarhane B ,Nasri L ,Benbekhta B, Khallaf M et Ennaji MM.(2014).*Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat marketed in rabat.*Innovation and applied studies*.**7**,1665-1670.
- Senviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF ,Samaranayake LP.(2013).Effect of culture media and nutrient of biofilms growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus feacalis* .*Archives of oral biology*.**58**,1327-1334.

- Sci DJ, Somers EB, Johnson ME et Wong ACL.(2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *International journal of biology*. **82**,1926-1936.
- Sofos, JN. (2014). Meat and meat products, Practical Guide for the Food Industry. Academic Press. pp. 119–162.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW.(2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology*. **56**,187-209.
- Tamime AY.(2002). Microbiology of starter cultures. Dairy microbiology handbook. Ed. Jhon Wiley and sons, inc.(New York). Pp 261-366.
- Tuttle J, Gomez T, Doly MP, Wells JG, Zhao T, Tauxe RV, Griggin PM.(1999). Lessons from large outbreak of *Esherichia coli* O157:H7 infections insight into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology infection*. **122**,185-192.
- Tondo EC, Malheiros PS, Passos CT, Casarin LS et Serraglio L.(2010). Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food control*. **21**,298-301.
- Vaillant V., Valk H et Baron E.(2006). Morbidité et mortalité dues aux maladies infectieuses d'origine alimentaire en France, *International Journal of Food Microbiology*, **5**.192p.
- Vanderleyden J.(2012). Salmonella in Foods: Evolution, Strategies and Challenges Cover image Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication . *Food Research Internationa* . **45**,502–531 .
- Warris DP. (2000). Meat Hygiene, Spoilage and Preservation (182-205). In *Meat Science An Introductory Text*. CABI Publishing, School of Veterinary Science, University of Bristol: Bristol, UK; 29p.
- Xu X, Wang H, Ding S, Dong Y, Yek H, Zhou G.(2013). Biofilm formation of *Salmonella* serotypes in simulated meat processing environments and its relationship to cell characteristics. *Journal of food protection*. **76**, 1984-1989
- Yokoyama MT, Johnson, KA, Johnson KA (1988). Microbiology of rumen and intestine in the ruminant animal digestive physiology and nutrition, edition: DC church. p125
- Zmirou, D, JP Ferley, JF Collin, M Charrel et J Berlin. (1987). A follow-up study of gastrointestinal diseases related to bacteriologically substandard drinking water. *American Journal of Public Health*. **77**, 582-584.

Résumé

Une estimation de l'état d'hygiène de 3 boucheries et 2 points de vente au niveau de la wilaya de Bejaia est effectuée dans cette étude. 30 souches lactiques et 34 souches pathogènes (6 souches de *Salmonella* sp., 18 de *S. aureus* et 10 d'entérocoques) ont été isolées et identifiées à partir de différentes surfaces (hachoirs, réfrigérateurs, tables recouvertes de nylon blanc, ustensiles de découpe, tables de découpe en bois, tables en acier inoxydable) et leur aptitude à adhérer et à former des biofilms a été mise en évidence. Des prélèvements mixtes ont été effectués pour le dénombrement de la FTAM, entérobactéries et des coliformes fécaux pour estimer la charge globale en ces flores. En parallèle, des prélèvements individuels (sur chaque surface) ont été effectués pour la recherche des bactéries pathogènes et lactiques. Les souches isolées ont été isolées et identifiées sur des milieux spécifiques puis étudiées quant à leur pouvoir à former des biofilms sur des microplaques en polystyrène. Les résultats obtenus ont montré qu'il ya une charge importante de bactéries sur l'ensemble des surfaces ainsi que la présence de souches pathogènes à des taux variables (16% *S. aureus*, 5% *Salmonella*) avec 15% d'entérocoques et 64% de bactéries lactiques. Ces résultats suggèrent que les conditions d'hygiène au niveau des boucheries et points de vente est à déplorer et doivent être revues afin de réduire les contaminations des viandes et ainsi assurer la sécurité du consommateur.

Mots clés : Boucherie, Hygiène, Bactéries lactiques, Bactéries pathogènes, Biofilms.

Abstract

An estimation of Hygiene of 3 butchers and 2 selling points at the wilaya of Bejaia was undertaken in this study. 30 lactic acid bacteria strains and 34 pathogenic strains (6 strains of *Salmonella* sp., 18 strains of *S. aureus* and 10 strains of enterococci), originally isolated and identified on different surfaces (choppers, fridges, tables covered with white nylons, cutouts utensils, wooden tables and stainless steel cut tables) and their ability to adhere and form biofilms. Mixed samples were taken for count of mesophilic aerobic bacteria, faecal coliforms and enterobacteria on handling surfaces in contact with meat in order to estimate the charge of these flora. In parallel, individual samples (on each surface) were taken to detect pathogenic and lactic acid bacteria. These strains were isolated and identified on specific media, then their power to form biofilms on polystyrene microtiter plates. The results have shown that there is a significant load of bacteria on all surfaces with presence of pathogenic strains at different levels (16% *S. aureus*, 5% *Salmonella*) with 15% enrococci and 64% lactic acid bacteria. The results suggested that the hygiene conditions on the butcher shops and selling points are deplorable and must be reviewed in order to reduce contamination of meat and ensure consumers security.

Keywords: Butcher, hygiene, Lactic acid bacteria, pathogens, biofilm

Annexe 3: Composition des milieux de culture selon (fournisseurs)

Tableau I : Milieu Chapman (pH 7, 2) (Biofilchem)

Composition	g/l
-Extrait de viande	1
-Peptone	10
-Chlorure de sodium	5
-Mannitol	10
-Rouge de phenol	25
-Gélose	15

Tableau II : Bouillon nutritif (BN, pH7, 4) (CONDA)

Composition	g/l
Extrait de viande	5g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g

Tableau III Bouillon Cœur Cervele (BHI, pH7, 4)

Composition	g/l
Proteose – peptone	10g
Infusion de cervelle de veau	12,5g
Chlorure de sodium	5g
Infusion de Cœur e bœuf	5g
Phosphate disodique	2,5g
Glucose	2g

Tableau IV: Gelose Slanetz Bartley (pH 7,2)

Composition	g/l
Extrait de levure	5g
Tryotose	20g
Glucose	2g
Phosphte disodiquel	4g
Azide de sodium	0,4g
Chlorure de tetrazolium(TTC)	0,1g
Gelose	14g

Tableau V : Bouillon MRS (de Man Rogosa et sharpe, pH 5,5)

Composition	g /l
Extrait de levure	5g
Extrait de viande	10g
Peptone	10g
Glucose	20g
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2g
Acetate de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate de manganésium	200mg
Sulfate de manganèse	50mg

Ajouter 15g/l d'agar pour avoir une gélose MRS

Tableau VI : Milieu Roth (pH7) (CONDA)

Composition	g/l
peptone	20g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate bipotassique	2,7g
Phosphate monoipotassique	2,7g
Azide de sodium	0,2g

Tableau VII : Giolitti et cantoni (GC, pH6, 9) (HIMEDIA)

Composition	g/l
Tryptone	10g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	5g
Chlorure de lithium	5g
Mannitol	20g
Chlorure de sodium	5g
Glycin	1,2g
Pyruvate de sodium	3g

Tableau VIII : Eau physiologique (pH7, 2)

Composition	g/l
Chlorure de sodium	8,5g
Eau distillée	1L

Tableau IX : Eau peptonée Tamponnée (pH7, 2)

Composition	g/l
Peptone	20g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	9g
Phosphate monopotassique	1,5g

Tableau X : Milieu désoxycholate (pH7, 2) (CONDA)

Composition	La quantité pour 1L
-peptone	10g
-Lactose	10g
-Desoxycholate de sodium	0,5/1g
- Chlorure de sodium	5 g
- Rouge neutre	30g
- Gelose	12g

Tableau XI : Sélénite-Cystéine (pH7, 2) (CONDA)

Composition	g /l
Tryptone	5g
Lactose	4g
Phosphate disodique	10g
Sélénite acide de sodium	4g
Cystine	100g

Tableau XII : Gélose M17 (pH 6, 5) (FLUKA)

Composition	g/l
Peptone de soja	5g
Peptone de viande	2,5g
Peptone de caséine	2,5g
Extrait de viande	5g
Extrait de levure	2,5g
Lactose	5g
Acide ascorbique	0,5g
Glycérophosphate de sodium	19g
Sulfate de magnésium	0,25g
Gélose	13g

Tableau XIII: Gelose Hektoen (pH7, 6) (FLUKA)

Composition	g/l
Proteose-peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiusulfate de sodium	5g
Sels billiaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fushine acide	0,1g
Bleu de bromothymol	65g
Gélose	13g

Tableau XIV : VRBL (Violet Crystal, Neutralred, Bile, Lactose, pH6, 9) (CONDA)

Composition	g/l
Extrait de levure	3g
Peptone	10g
Chlorure de sodium	5g
Lactose	10g
Saccharose	10g
Rouge de phenol	80g
Vert brillant	12,5g
Gélose	20g

Tableau XV: Gelose PCA (Plat Count Agar, pH7)

Composition	g/l
Tryptone	5
Extrait de levure	2,5
Glucose	1
Agar agar	15

Annexe 1 : Résultats obtenus des dénombrements et caractéristiques des souches recherchés

Tableau I : Les résultats obtenus des dénombrements de la flore aérobie mésophile totale, Entérobactéries, Coliformes fécaux sur la différente surface de boucherie.

boucheries flores	FTAM			Entérobactéries			Coliformes fécaux	
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-3}
Em(B1)	Ind	20.10^5	/	$0,063.10^5$	$0,01.10^5$	/	Abs	Abs
Em(B2)	Ind	Ind	$52.8 \cdot 10^5$	$14 \cdot 10^5$	$9,5.10^5$	$6,92.10^5$	Abs	Abs
Em(B3)	$5,32.10^5$	$5,20.10^5$	/	/	$0,02 \cdot 10^5$	$0,1.10^5$	$0,002.10^5$	Abs
Em(B4)	$8,8.10^5$	13.10^5	/	12.10^5	$0,2.10^5$	$0,06.10^5$	$0,13 \cdot 10^5$	$0.024.10^5$
Em(B5)	$1.65.10^5$	$0.78.10^4$	$0.21.10^5$	Abs	Abs	Abs	Abs	Abs

Em: Echantillon mixte Indn : Indénombrable Abs : Absence B : Boucherie

Tableau VII : Caractéristiques des souches isolées de *Staphylococcus aureus* de l'identification par le test de la coagulase et la la catalase

	Coagulase t =2h	Coagulase t=4h	Coagulase t= 6h	Cogulase t =18h	Catalase	Aspect des colonies
E1A1S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaunes
E1A1S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A1S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A1S4	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A1S5	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A2S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A2S2	-	-	-	-	-	Petites colonies jaune
E1A2S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A2S4	-	-	-	+	+	Grosses colonies jaune
E1A2S5	-	-	+	+	+	Grosses colonies jaune
E1A3S1	+	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E1A3S2	+	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E1A3S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A3S4	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A3S5	-	-	-	-	+	Petites colonies jaunes
E1A5S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A5S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A5S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A5S4	+	+	+	+	+	Petites colonies jaune
E1A5S5	-	-	-	-	+	Petites colonies jaunes
E1A4S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E1A4S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune

E1A4S3	+	+	+	+	+	Petites colonies jaune
E1A4S4	+	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E1A4S5	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A1S1	-	-	-	-	+	Petite colonies jaune
E2A1S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A2S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A2S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A3S1	-	+	+	+	+	Grosses colonie jaune
E2A3S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A4S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A4S2	+	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E2A5S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E2A5S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A1S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A1S2	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A1S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A1S4	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A1S5	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A2S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A2S2					+	Petites colonies jaune
E3A2S3	-				+	Petites colonies jaune
E3A2S4	-				+	Petites colonies jaune
E3A2S5	-				+	Petites colonies jaune
E3A3S1	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A3S2	-	+	+	+	+	Grosses colonies

						jaune
E3A3S3	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A3S4	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E3A3S5	-	-	-	-	+	Grosses colonies jaune
E3A4S1	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A4S2	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A4S3	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A4S4	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E3A4S5	-	+	+	+	+	Grosses colonies jaune
E4A5S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E4A5S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E5A3S1	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune
E5A3S2	-	-	-	-	+	Petites colonies jaune

(+) : Positifs (-) : Négatifs

Sommaire

Introduction

Synthèse bibliographique

Chapitre I
Filière viande et risques
Sanitaire

Chapitre II
Biofilm

Partie pratique

Chapitre I
Matériels et méthodes

Chapitre II
Résultats et discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

Tableau II : Caractéristiques culturales des souches de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, Entérocoques, et Bactéries lactiques, isolées de la première boucherie (B1)

	<i>Staphylococcus.aureus</i>		<i>Salmonella</i>			Entérocoque			Bactéries lactique		
	GC	CHAP-MAN	Eau peptoné	SFB	Hectoen	ROTH	EVA-LITZKY	SLANEETZ	MRS	M17	MRS
A1	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites colonies crémeuses	Petites colonie crémeuses
A2	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies saumon	-	-	Absence de colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites colonies crémeuses
A3	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonie crémeuses	Petites colonies crémeuses
A4	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites colonies crémeuses
A5	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses

GC : Giolliti Contoni (+) : trouble (-) : Absence de trouble .

Tableau III : Caractéristiques culturales des souches de *Staphylococcus*, *salmonella* , Entérocoque, et Bactéries lactiques, isolées de la deuxième boucherie (B2)

	<i>Staphylococcus.aureus</i>		<i>Salmonella</i>			Entérocoque			Bactéries lactique		
	GC	CHAPMAN	Eau peptoné	SFB	Hectoen	ROTH	EVALITZKY	SLANETZ	MRS	M17	MRS
A1	(+) Avec noircissement	Colonie jaune	+	+	Colonies Bleu vertes	+	+	Petites Colonie rose	+	Petites Colonies crémeuse	Petites Colonies crémeuse
A2	(+) Avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies vertes a Centre noir	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies Crémeuses
A3	(+) Avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies vertes a Centre noir	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuse
A4	(+) Avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies vertes a Centre noir	+	+	Petite Colonies roses	+	Petite Colonie Crémeuses	Petites Colonies Crémeuses
A5	(+) Avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies vertes a Centre noir	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses

Tableau IV : Caractéristiques culturales des souches de *Staphylococcus*, *salmonella* ,Entérocoque, et Bactéries lactiques, isolées de la boucheries trois (B3)

	<i>Staphylococcus.aureus</i>		<i>Salmonella</i>			Entérocoque			Bactéries lactique		
	GC	CHAP-MAN	Eau peptoné	SFB	Hectoen	ROTH	EVA-LITZKY	SLANETZ	MRS	M17	MRS
A1	+ avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A2	+ avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A3	+avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies crémeuse	Petites Colonies crémeuses
A4	+avec noircissement	Colonies jaune	+	+	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies roses	+	Petites Colonies Crémeuses	Petites Colonies Crémeuses

GC : Giolliti Contoni (+) : trouble (-) : Absence de trouble

Tableau V: Caractéristiques cultural des souches de *Staphylococcus*, *salmonella*, Entérocoque, et Bactéries lactiques, isolées du point de vente 1 marché (B4)

	<i>Staphylococcus</i>		<i>Salmonella</i>			Entérocoque			Bactéries lactique		
	GC	CHAP -MAN	Eau peptoné	SFB	Hectoen	ROTH	EVA-LITZKY	SLANETZ	MRS	M17	GMRS
A4	+avec noircissem ent	Colonie jaune	+	+	Colonies verte a Centre noir	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A'2	+	Absence de colonies jaune	+	+	Colonies verte a Centre noir	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A3	+	absence de colonies jaune	+	+	colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A5	+avec noircissem ent	Colonie jaune	+	+	Colonies verte a Centre noir	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies Crémeuses	Petites Colonies crémeuses

GC : Giolliti Contoni (+) : trouble (-) : Absence de trouble

Tableau VI: Caractéristiques culturelles des souches de *Staphylococcus*, *salmonella*, Entérocoque, et Bactéries lactiques, isolées du point de vente 2 (B5)

	<i>Staphylococcus</i>		<i>Salmonella</i>			Entérocoque			Bactéries lactique		
	GC	Chapman	Eau peptonée	SFB	Hectoen	ROTH	EVA-LITZKY	Slanezt	MRS	M17	MRS
A'2	(+)	Absence de colonies jaune	+	-	Colonies saumon	+	+	Petites Colonie rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A3	(+)avec noircissement	Colonie jaune	+	-	Colonies bleu vert	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses
A4	+	Absence de colonies jaune	+	-	Colonies saumon	+	+	Petites Colonies rose	+	Petites Colonies crémeuses	Petites Colonies crémeuses

GC : Giolliti Contoni (+) : trouble (-) : Absence de trouble

Tableau VIII : Caractéristiques obtenu lors de l'identification des Entérocoques sur Bouillon MRS à PH=9.6, bouillon MRS (Nacl= 6.5%), traitement thermique a 60°C pendant 30minutes et croissance a 44°C

	test code	MRS PH=9.6	MRS Nacl=6.5%	Croissance a 44°C	MRS tth 60°C pendant 30min
E1	S1 A5	+	+	-	-
	S1 A4	+	+	+	+
	S2 A1	+	+	-	-
	S1 A2	-	+	-	-
	S2 A3	+	+	+	+
E2	S1 A1	+	+	+	+
	S1 A5	+	+	-	-
	S1 A4	+	+	-	-
	S2 A3	-	+	-	-
	S2 A2	+	+	-	-
E3	A2	-	+	+	-
	A4	+	+	+	+
	A1	+	+	+	+
	A3	-	+	+	-
E4	A4	+	+	+	+
	A2'	+	+	+	+
	A3	+	+	+	+
	A5	+	+	+	+
E5	A4	-	+	+	+
	A2'	-	+	+	-
	A3	+	+	+	+

Tth : Traitement thermique (+) : Trouble (-) : absence de trouble

Tableau IX : Caractéristiques obtenu lors de l'identification après coloration de Gram des coques lactique sur MRS plus cloche, MRS à PH=9.6, bouillon MRS Nacl=6.5%, traitement thermique a 60°C pendant 30minutes et croissance a 44°C

Test Code	GAZ	MRS PH=9.6	MRS Nacl=6.5%	Croissance a 44°C	MRS tth 60°C pendant 30min	Aspect microscopique des colonies
E1 A4 S1	-	+	+	+	+	Coques, tétrade
E2 A1 S1	-	-	+	-	-	Coques, tétrade
E1 A1 S1	-	-	+	-	-	Coques, tétrade
E1 A5 S2	-	+	+	+	-	Coques, tétrades
E2 A4 S1	-	+	+	+	+	Coques, tétrade
E1 A2 S3	-	+	+	-	-	Coques, tétrade
E1 A2 S2	-	+	+	+	+	Coques, tétrade
E1 A2 S1	-	+	+	+	+	Coques, tétrade
E1 A1 S2	-	+	+	+	+	Coques, tétrade

Tth : traitement thermique (-) : absence de trouble (+) : trouble

Tableau X : Caractéristiques obtenu lors de l'identification des bacilles lactique après coloration de Gram sur MRS plus cloche et croissance a 44°c

test Code	Gaz	Croissance 44°c	Aspect microscopique des cellules
E1 A4 S1	+	+	Long Bacilles
E1 A3 S1	+	+	Coccobacilles
E1 A1 S1	-	+	Bacilles
E1 A1 S3	-	+	Long Bacilles
E1 A1 S2	-	+	Bacilles
E1 A1 S4	-	+	Bacilles
E2 A3 S1	-	+	Petit Bacilles
E2 A2 S1	-	+	Bacilles
E2 A3 S2	-	+	Petit Bacille
E1 A2 S2	+	+	Bacilles
E1 A1 S5	+	+	coccobacilles
E1 A5 S1	-	+	Coccobacille
E1 A1 S6	+	+	Petit bacille
E2 A2 S3	-	+	Coccobacilles
E2 A5 S1	+	+	Bacilles
E2 A4 S1	-	+	Coccobacilles
E2 A4 S2	+	+	Coccobacilles
E2 A2 S4	+	+	Coccobacilles
E2 A3 S3	-	-	Coccobacilles
E2 A1 S1	-	+	Coccobacilles
E2 A2 S5	-	+	Coccobacilles

(-) : Absence de trouble (+) : Trouble

Tableau XI : caractéristiques biochimique des souches isolées sur hektoen lors de l'identification de *Salmonella* par mini galerie biochimique

	Salmonella	TSI	Citrate de Simmons	Mannitol mobilité
E2	A2 S1	Pente rouge Culot jaune Abs de Noircissement et bulle de gaz	Vert	Jaune en anaérobiose, rouge en aérobie et trouble autour de la pique centrale
	A2 S2	Pente rouge culot jaune Noircissement et bulle de gaz	Bleu vif	Jaune en anaérobiose, rouge en aérobie trouble autour de la pique centrale
	A5 S1	Pente rouge, culot jaune noircissement et bulle de gaz	Vert	Jaune et trouble autour de la pique centrale
	A4 S2	Pente rouge culot jaune pas de noircissement mais bulle de gaz	Vert	Jaune et trouble autour de la pique centrale
E4	A5 S1	Culot noir pente rouge bulle de gaz	Bleu	Jaune et trouble autour centrale autour de la pique centrale
	A'2 S2	Pente rouge Culot noir et bulle de gaz	Vert	Jaune, Trouble autour Pique centrale
	A4 S1	Noircissement de tout le tube mais pas de bulle de gaz	Plus au moins bleu	Jaune, Trouble autour Pique centrale
	A5 S2	Culot noir pente jaune avec extrémité rouge et bulle de gaz	Bleu	Jaune en anaérobiose rouge en aérobie
E5	A4 S2	Culot jaune pente rouge abs de noircissement mais bulle de gaz	Vert	Jaune et trouble autour de la pique centrale

Tableau XII : caractéristiques obtenus lors de l'identification de *E. coli* et par mini galerie biochimique (TSI, Citrate de Simmons, Mannitol mobilité et urée indole) de souche isolés sur VRBL.

E. Coli	Croissance a 44°C sur VRBL	TSI	Citrate de Simmons	Mannitol mobilité	Urée indole	
E3	S1 10 ⁻²	Colonie violette entourées halo rougeâtre	Jaune et bulle de gaz	Vert	Jaune, trouble autour de la piqure centrale	Milieu orangé (inchangé) et l'anneau reste orangé
	S2 10 ⁻²	Colonie violette entourées halo rougeâtre	Jaune et bulle de gaz	Vert	Jaune, trouble autour de la piqure centrale	Milieu orangé (inchangé) et l'anneau reste orangé
E4	S1 10 ⁻²	Colonie violette entourées halo rougeâtre	Jaune et bulle de gaz	Vert	Jaune, trouble autour de la piqure central	Milieu orangé (inchangé) et l'anneau reste orangé
	S2 10 ⁻²	Colonie violette entourées halo rougeâtre	Jaune et bulle de gaz	Vert	Jaune, trouble autour de la piqure central	Milieu orangé (inchangé) et l'anneau reste orangé
	S1 10 ⁻³	Colonie violette entourées halo rougeâtre	Jaune et bulle de gaz	Vert	Jaune, trouble autour de la piqure central	Milieu rouge et L'anneau reste orangé

Annexe 2 : code descriptif des échantillons

Tableau I : Description des échantillons .

Boucherie/ point de vente	A1	A2	A'2	A3	A4	A5
B1	Hachoir (viande rouge)	Réfrigérateur d'entreposage (volaille et viande rouge)	/	Ustensiles de découpe (volaille et viande rouge)	Surface de découpe en bois (volaille et viande rouge)	Surface en acier inoxydable (volaille et viande rouge)
B2	Hachoir (viande rouge)	Réfrigérateur d'entreposage (volaille et viande rouge)	/	Ustensiles de découpe (volaille+viande rouge)	Surface de découpe en bois (volaille et viande rouge)	Surface en acier inoxydable (volaille et viande rouge)
B3	Hachoir (viande rouge)	Réfrigérateur d'entreposage (volaille et viande rouge)	/	Ustensiles de découpe (volaille et viande rouge)	Surface de découpe en bois (volaille et viande rouge)	Surface en acier inoxydable (volaille et viande rouge)
B4	/	/	Table d'exposition recouverte de nylon blanc (bouzelouf)	Ustensiles de découpe (bouzelouf+ Volaille)	Surface de découpe en bois (Volaille)	Surface en acier inoxydable (volaille)
B5	/	/	Table d'exposition recouverte de nylon blanc (viande rouge)	Ustensiles de découpe (viande rouge)	/	Surface de découpe en bois (viande rouge)

B :Boucherie A :surface