

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
Spécialité : Microbiologie Appliquée au Diagnostic



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme
MASTER
Thème

La Recherche des Bactéries
Entéropathogènes dans la salade

Présenté par :

BOUFLIH MAYSSA & ARBOUCHE MARWA

Soutenu le : **30 juin 2024**

Devant le jury composé de :

M^{me}. MOUCI K	MCB	Présidente
M. TOUATI A	Professeur	Promoteur
M^{me}. SOUAGHI S	MCA	Examinatrice

Année universitaire : 2023/2024

REMERCIEMENT

*Avant tout, c'est grâce à la volonté de **DIEU** Tout-Puissant que nous avons pu terminer ce travail et arriver à ce stade.*

*Nous tenons à exprimer nos profonds remerciements et notre vive reconnaissance à notre promoteur, le **Pr TOUATI ABDLAZIZ**, pour tous ses efforts. Il a su, à sa manière, nous conseiller et nous orienter tout au long de la réalisation de ce travail. Nous le remercions vivement pour son encadrement brillant et bienveillant.*

Ensuite nous tenons à remercier tous nos chers professeurs qui nous ont accompagnés tout au long de notre parcours. Certains d'entre eux nous ont marqué à jamais en nous apprenant les valeurs de notre cursus.

*Nous tenons également à remercier la doctorante **BOUZIAN MARWA** pour son aide, sa générosité et soutien. Elle nous a donné des conseils et des remarques à précieuses concernant notre travail.*

Enfin, nous adressons nos vifs remerciements aux membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer ce modeste travail.

Dédicaces

Je commence par rendre grâce à DIEU et à sa bonté, pour la patience, la compétence et le courage qu'il m'a donné pour arriver à ce stade. Avec tout mon amour éternel et avec l'intensité de mes émotions. Je dédie ce mémoire aux deux personnes les plus chers au monde :

A mon cher père, l'amour qui m'a donné, sans oublier ses sacrifices ; Pour son encouragement ; il a fait plus qu'un père puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études : je te souhaite la joie et de bonne santé chère papa.

A celle qui m'a transmis la vie, l'amour, le courage, à toi chère maman toutes mes joies, mon amour et ma reconnaissance.

A mes frères Laid, Tarik, Yasser et Amir : en témoignage de mon amour éternel que Dieu vous garde, vous protège et vous offre une vie pleine de joie et de réussite.

A mes sœurs, Bassma et sabah, qui ont été toujours avec moi, avec qui je partage mon male, mon bonheur et bien sur ma vie, je vous souhaite une vie pleine d'amour et de réussite et une bonne santé.

Aux femmes de mes frères, zahra et howa.

A mes neveux, Mohamed Iyad, Aya Israa, et Mohamed Fadel, foudil mohammed amine, moad loai, ranime mirale, rawane, abd el samad ,messiliya rinade, ghayth , rayane et waeel ; mes plus grandes sources de bonheur, j'espère que la vie lui réserve le meilleur.

Vous avez toujours été là pour moi, m'entourant de votre bienveillance usant de tous les sacrifices possibles. Ce travail n'est que le fruit de vos soutiens, de vos prières, de votre amour profond. Je souhaite que ce mémoire vous apporte la joie.

A tous mes oncles et tantes, cousins et cousines sans exception ; pour votre sympathie, douceur et gentillesse. Je vous souhaite beaucoup de succès, de courage et de bonheur.

A mes adorables amies, imane, sirine, mayliss, zineb, lidia, djamila, Nora, ibtihel, nadjia , chaima ,pour leur fidélité et leur aide.

A ma chère binôme marwa ; avec laquelle j'ai partagé mes moments de joie et de stresse, de bonheur et de malheur, avec laquelle j'ai des souvenir inoubliable. Je lui dis excusé-moi si je t'ai brisé un jour avec un mot ou geste mais soyer sur que ce n'est pas de mon profond puisque tu comptes beaucoup pour moi chère sœur. Que Dieu nous garde ensemble pour toute notre vie.

Que toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Tous les mots que je pourrais utiliser seraient insuffisants pour vous témoigner l'amour que je vous porter. J'espère être à la hauteur de votre attente. Que dieu vous préserve et vous prête longue vie de joie.

MAYSSA

DÉDICACES

Tout d'abord, je voudrais me remercier d'avoir cru en moi. Pour avoir toujours été là pour moi et pour ne jamais me laisser tomber quand les choses se sont vraiment détériorées, pour n'avoir jamais cru en ma capacité à surmonter ces défis. Je suis reconnaissant à moi-même d'avoir toujours trouvé la force de continuer, même dans les moments les plus sombres, et de ne jamais laisser rien enlever mon beau sourire.

***A ma chère grand-mère** « Boughalim Kheira ». Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération, pour tous les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien, la tendresse et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, vous m'avez permis et donné l'envie de faire ce métier. Vous êtes ma raison de vivre, la source de mes joies et le secret de ma force. Aucun travail n'aurait été accompli sans vous et sans vos prières. Je mets entre vos mains le fruit de ce petit travail, que ce travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices. Bien que je ne vous en acquitte jamais. Puisse DIEUX le très haut vous accorde santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive. Je vous aime tant.*

***A mémoire de mon défunt frère** « Koiche Abdel kader » qui restera pour toujours graver dans mon cœur.*

***A mes chères amies** : Sonia, Hadjer, Saliha, Nounou, Maya, Amira, Fairouz, Yasmine, et surtout mon binôme Mayssa, je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et de souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et grand merci pour votre soutien, vos encouragements et votre aide. Je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. A tous ceux qui me sont chers et qui ne méritent pas d'être oubliés.

MARWA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....01

Bibliographie

I. Généralités sur les bactéries Entéropathogènes.....	03
1. Définition et caractéristiques généraux.....	03
2. Position taxonomique	03
3. Etudes de quelques genres et espèces particuliers	04
3.3. <i>Salmonella</i>	04
3.3.1. Habitat.....	05
3.3.2. Mode de transmission.....	05
3.3.3. Pouvoir pathogène.....	06
3.1. <i>Listeria</i>	06
3.1.1. Habitat.....	06
3.1.2. Mode de transmission.....	07
3.1.3. Pouvoir pathogène.....	07
3.3. <i>Escherichia coli</i> Entérohémorragique (EHEC).....	07
3.3.1. Habitat.....	08
3.3.2. Mode de transmission.....	08
3.3.3. Pouvoir pathogène.....	09
II. Généralités sur la laitue	
1. Définition.....	10
2. Origine de la laitue.....	10
3. Taxonomie.....	10

4. Source de contamination de la laitue par les Entéropathogènes.....	11
---	----

Matériel et Méthodes

1. Cadre d'étude.....	12
2. Matériel et méthode.....	12
2.1. Prélèvement.....	12
2.1.1. Lieu de prélèvement.....	12
2.1.2. Période de prélèvement.....	13
2.1.3. Technique de prélèvement.....	14
2.2. Echantonnage.....	14
2.2.1. Transport des échantillons.....	14
2.3. Recherche des germes.....	14
2.3.1. Pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification.....	14

Résultats et discussion

1. Examen macroscopique.....	21
2. Examen microscopique.....	23
3. Identification biochimique.....	23
3.1 Test de l'oxydase.....	23
3.2 Test de catalase.....	23
3.3 Test citrate de Simmons.....	24
3.4 Recherche de l'utilisation du glucose, du lactose, de la production de gaz et H ₂ S sur TSI.....	24
3.5 Le test de RM et du VP.....	24
3.6 Test Urée /Indole/Tryptophane.....	24
3.7 Assimilation des sucres « Rhamnose, Xylose ».....	25
3.8 Test d'hémolyse.....	25

3.9 Recherche de lécithinase.....	26
Discussion.....	28
Conclusion.....	32

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

Liste des Abréviations

- ❖ **BLEB**: Buffered Listeria enrichment broth
- ❖ **BL** : bouillon lactose
- ❖ **CS** : Citrate de Simmons
- ❖ **EPT** : Eau peptone tamponnée
- ❖ **E. Coli** : Escherichia coli
- ❖ **EHEC** : Escherichia coli Entérohémorragique
- ❖ **EPEC** : Escherichia coli Entéropathogènes
- ❖ **EDTA**: Ethylene diaminetetracetic acid
- ❖ **IND**: Indole
- ❖ **LACT** : Lactose
- ❖ **L** : Laitue
- ❖ **Mac.s** : Mac conky sorbitol
- ❖ **MAN**: Mannitol
- ❖ **T**: Température
- ❖ **TSA**: Gélose tryptone soja
- ❖ **TSI** : triple sugar iron
- ❖ **RV**: Rappaport vassiliadis
- ❖ **Vp** : Voges proskauer
- ❖ **Sor** : Sorbitol
- ❖ **S** : Souche
- ❖ **Spp** : Espèces
- ❖ **URE**: Urée
- ❖ **XLD**: Xylose Lysine Désoxycholate

Liste des figures

N° de figure	Désignation
01	Les voies de contamination par E. coli
02	Site de prélèvement de marché EDIMCO
03	Site de prélèvement de marché EL KSEUR
04	Site de prélèvement de marché el Qouds
05	Aspect des salmonelles sur gélose XLD
06	Aspect de listeria sur gélose PALCAM
07	Aspect des colonies EHEC sur Mac-Conky Sorbitol(SMAC)
08	Résultats de test catalase
09	Résultats de test oxydase
10	Aspect d'hémolyse sur gélose au sang
11	Aspect des colonies positives sur gélose Baird Parker
12	Résultats de test citrate de Simmons
13	résultat des tests Rhamnose et Xylose

Liste des Tableaux

N° de Tableau	Désignation
N° I	Taxonomie des bactéries Entéropathogènes
N° II	Classification de quelque bactérie Entéropathogènes
N° III	Périodes et sites des prélèvements
N° IV	Résultats d'isolement des souches suspectes dans les milieux de cultures sélectifs
N° V	Résultat d'identification biochimique de listeria

Introduction

Le concept de One Health « Une seule santé » pour un seul monde vise à améliorer la santé des humains, des animaux et des écosystèmes. Cette approche s'applique à un large éventail de questions (Buntain et al., 2020).

Principalement, la protection sanitaire des aliments et les maladies d'origine alimentaire, causées par la contamination des aliments et survenant à n'importe quel stade de la chaîne de production, de la livraison et de la consommation des aliments (Shaheen, 2022).

De plus en plus, la sécurité alimentaire est un enjeu majeur pour la santé publique dans de nombreux pays, en raison des contaminants biologiques. Dans les pays en développement, cette situation est particulièrement préoccupante en raison de méthodes de préparation de nourriture non sanitaires, en particulier en Algérie (Mairi et al., 2018).

Les agents bactériens responsables de l'évolution des risques de maladies liés à l'ingestion de la laitue sont : *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* et *Listeria monocytogènes*. Elle sont identifiés comme responsables d'épidémies liées à la consommation de légumes à feuilles (Mogren et al., 2018) et peuvent avoir un impact considérable sur la santé des individus. On estime que *E. coli*, producteur de la toxine de Shiga (STEC), est l'un des principaux pathogènes alimentaires chez l'homme (Mogren et al., 2018).

Différentes sources peuvent être à l'origine de la contamination post récolte, au niveau de la ferme, allant de l'environnement à la manipulation humaine et à l'exposition aux animaux. L'épandage inapproprié d'engrais organiques et de fumier, l'intrusion du bétail dans les champs et l'utilisation d'eau insalubre pour l'irrigation contribuent tous à la contamination des végétaux sur place (Mairi et al. 2018 ; Rahman et al. 2021).

Les produits frais en général ont connu une augmentation au cours des vingt dernières années (Olaïmat & Holley, 2012). Bien qu'ils représentent un risque d'infection pour les consommateurs, ils sont naturellement porteurs d'une communauté microbienne non pathogène, (Araújo et al., 2017).

La laitue est une plante herbacée en rosette appartenant à la famille des Astéracées. Elle est largement appréciée et cultivée à travers le monde, faisant partie des légumes les plus populaires. Elle peut être cultivée en plein champ ou sous abri, et sa demande est si élevée qu'elle atteint une production annuelle dépassant les 22 millions de tonnes (Zorrig, 2011).

Introduction

Nous nous sommes intéressés aux laitues des marchés et des fermes de Bejaia dans le but de récolter des données locales pour évaluer la présence de pathogènes et des indicateurs de contamination alimentaire tels que *Listeria*.

L'objectif de notre travail est d'évaluer la sécurité alimentaire liée à la consommation de laitue et de sensibiliser aux risques pénitentiels pour la santé publique.

I. Généralités sur les bactéries Entéropathogènes :

1. Définition et caractéristiques généraux :

Les bactéries Entéropathogènes sont des micro-organismes appartenant à diverses familles de bactéries, comprenant un large éventail d'espèces. Phénotypiquement, elles sont souvent des bacilles Gram négatifs, rarement Gram positifs et peuvent être mobiles grâce à des flagelles péritriches ou immobiles (Chiaretti et al., 2014).

Généralement, elles ne forment pas de spores, sont des bactéries facultativement anaérobies et fermentent le glucose. Elles sont catalase positive et oxydase négative. Ces bactéries possèdent divers facteurs de virulence, tels que les adhésies et les toxines, qui leur permettent de coloniser la muqueuse intestinale et de provoquer des symptômes pathologiques, (douleur abdominale) (Chiaretti et al., 2014),

Ce type de bactéries peut provoquer des infections gastro-intestinales chez l'homme, entraînant des symptômes tels que la diarrhée, les nausées, les vomissements, les crampes abdominales, ainsi que des complications parfois graves comme la déshydratation. En général, ces bactéries sont transmises par l'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, par le contact direct avec des surfaces infectées ou des personnes déjà infectées (Heaton et Jones, 2008).

2. Position taxonomique :

Les Entéropathogènes constituent un grand groupe des bactéries présentant une forte similitude et des affinités évidentes. Ces bactéries appartiennent souvent du phylum des *Proteobacteria*. Elles sont principalement des *Enterobacterales* et des *Enterobacteriaceae* à l'exception de *Campylobacter jejuni*, qui appartient à l'ordre des *Campylobacterales*, et à la famille des *Campylobacteraceae*. Ces catégories mettent en évidence à la fois leurs similitudes taxonomiques et leurs différences biologiques et pathogènes (Janda, 2016).

Tableau I : la taxonomie des bactéries Entéropathogènes (Janda, 2016)

Domaine	Eubacteria
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Enterobacteriale</i>

Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
----------------	---------------------------

La taxonomie des bactéries Entéropathogènes est essentielle pour comprendre leurs caractéristiques microbiologiques, leur épidémiologie et leur pathogénicité, ainsi que pour développer les stratégies efficaces de diagnostic, de traitement et de prévention des maladies qu'elle provoquent (Ceuppens et al., 2014).

Tableau II : Classification de quelque bactérie Entéropathogènes(Ilic et al., 2022).

	Genres	Espèces
Les Entéropathogènes	<i>Escherichia</i>	Six espèces: <i>Escherichia coli</i> ...
	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella bongori</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. subterranean</i> ...
	<i>Listeria</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria ivanovii</i>
	<i>Proteus</i>	Six espèces : <i>Proteus vulgaris</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. penneri</i> ...
	<i>Klebseila</i>	Quatre espèces : <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae subsp. ozaenae</i> ...
	<i>Shigella</i>	Quatre espèces : <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> , <i>S. boydii</i> .
	<i>Serratia</i>	Onze espèces : <i>Serratia marcescens subsp. marcescens</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. rubidaea</i> ...

3. Etudes de quelques genres et espèces particuliers :

Les bactéries Entéropathogènes regroupent plusieurs espèces. Dans notre étude, nous sommes concentrés sur l'analyse et la recherche de trois de ces bactéries : *Salmonella*, *Listeria* et *EHEC* (*Escherichia coli* Entérohémorragique).

3.1 Les Salmonelles

Les salmonelles sont des bactéries Entéropatogènes, ce sont des bacilles Gram négatif, aéro-anaérobies facultatif. Ces bactéries possèdent un métabolisme oxydatif et fermentaire.

Les salmonelles sont classées suit (**Le Minor, 1992**) :

Domaine: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Classe: *Gammaproteobacteria*

Ordre : *Enterobacteriale*

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *salmonella*

Les salmonelles sont principalement pathogènes pour l'homme, étant responsables de nombreuses infections telles que les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, les gastro-entérites et les toxi-infections alimentaires.

Les hybridations ADN/ADN ont confirmé que toutes les souches de salmonelles se répartissent en deux espèces principales : *salmonella enterica*, *salmonella bongori*, cette dernière étant rarement isolée chez l'homme(**Youté et al, 2024**).

3.1.1 Habitat

Les salmonelles sont généralement présentes dans les intestins des animaux et des oiseaux. Leurs excréments peuvent contaminer le sol, l'eau, ainsi que les aliments d'origine animale, notamment la volaille, les œufs et les produits laitiers. Cependant, tous les aliments, y compris les fruits et les légumes insuffisamment lavés, peuvent également être contaminés (**Billah & Rahman, 2024**).

3.1.2 Mode de transmission

Les salmonelles sont excrétées principalement excrétées par les matières fécales et parfois par les urines.

La bactérie se transmet par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés, directement ou indirectement, par le biais d'excréments infectés(**Ilic et al., 2022**).

3.1.3 Pouvoir pathogène

La salmonellose se manifeste généralement chez la plupart des individus par des crampes abdominales, la diarrhée et la fièvre. Ces symptômes apparaissent typiquement de 12 à 72 heures après ingestion de l'aliment contaminé (Yue & Schifferli, 2014).

3.2 Listeria

Listeria est un organisme pathogène, de bacille Gram positif, de bâtonnets courts, non acido-résistantes, non capsulées et non sporulées, aéro-anaérobie facultatif et mobile à 20°C, elle se trouve dans le sol, l'eau, et les végétaux (Rocourt & Seeliger, 1985).

Classification de *Listeria*: (Rocourt, 1988)

Domaine : *Eubacteria*

Phylum : *Firmicutes*

Classe : *Bacilli*

Ordre : *Bacillales*

Famille : *Listeriaceae*

Ce genre est constitué de huit espèces : *Listeria grayi*, *Listeria ivonovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*, *Listeria murrayi* et *Listeria rocourtiae*, *Listeria monocytogenes*, cette dernière est plus fréquente dans les végétaux et responsable d'infection chez l'homme et l'animal (Rocourt & Seeliger, 1985).

3.2.1 Habitat

Cette bactérie est largement présente dans l'environnement et a été identifiée dans divers habitats tels que le sol, l'eau, la végétation, les eaux usées, les produits alimentaires,

ainsi que dans les environnements agricoles et de transformation des aliments (**Romagnoli et al. 2017**).

3.2.2 Mode de transmission

La transmission de cette bactérie se fait principalement par ingestion d'aliments contaminés (**Schlech, 1984**).

3.2.3 Pouvoir pathogène

Listeria monocytogenes responsable de Listériose, une maladie infectieuse qui affecte à la fois les humains et les animaux. La Listériose humaine, c'est une maladie infectieuse rare et très grave, reconnue comme l'une des maladies d'origine alimentaires les plus sévères, nécessitant une déclaration obligatoire.

Cette infection peut entraîner une fausse couche chez la femme enceinte et infecter le fœtus. Elle peut également affecter le système nerveux en provoquant des méningites et des encéphalites et peut être mortelle en causant une septicémie (**Berche, 1995**).

3.3 EHEC

Le genre *Escherichia* englobe cinq espèces : *E. coli*, *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* et *E. blattae*. Parmi celles-ci, *EHEC* est une bactérie entéropathogène, de bacille à coloration de Gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif, bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non sporulée. Elle se trouve naturellement dans le tractus intestinal des humains et des animaux. Cette espèce se distingue par sa diversité génétique et son potentiel pathogène varié (**Mazaheri et al., 2014**).

Classification d'*Escherichia coli* Entérohémorragiques (EHEC) (Abu-Ali et al., 2009)

Domaine : *Bacteria*

Embranchement : *Proteobacteria*

Classe : *Gammaproteobactéria*

Ordre : *Entérobactérie*

Famille : *Enterobactériaceae*

Genre : *Escherichia*

Espèce : *Escherichia coli*.

3.3.1 Habitat

Les *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC) sont habituellement présents dans le tube digestif, principalement dans la partie distale de l'iléon et dans le colon chez l'homme, ainsi que chez la plupart des animaux à sang (Wright et al., 2022. Mazaheri et al., 2014).

Ils peuvent également se retrouver dans les eaux, le sol, et dans des nombreux aliments crus et se transmettre facilement aux aliments cuits par la contamination des mains du personnel, des surfaces de travail, des récipients et des divers équipements. La présence de EHEC rend l'eau ou les aliments inappropriés pour être utilisés ou consommés (Landstorfer et al., 2014).

3.3.2 Mode de transmission

Les recherches en épidémiologie analytiques et les études sur les épidémies, ont contribué à approfondir notre compréhension et nos connaissances sur les modes de transmission et les sources de contamination d'EHEC. Actuellement, les principaux modes de transmission incluent d'aliments et de végétaux contaminés, la transmission hydrique (via l'eau potable ou lors de baignade), la transmission interhumaine par voie oro-fécale, ainsi que le contact avec les animaux et leur environnement (Wright et al, 2022).

- La plupart des infections est le résultat d'une transmission alimentaire, proviennent de la consommation des viandes et des végétaux contaminés. La viande de bœuf et les végétaux constituent la source majeure de contamination, principalement en raison d'une cuisson insuffisante (Loiseau-Marolleau & Bentaiba, 1976).

- Les épidémies d'origine hydrique sont généralement associées à la consommation d'eau potable contaminée ou à l'ingestion accidentelle d'eau lors de baignades dans des lacs, ou autre étendues d'eau naturelle(Loiseau-Marolleau & Bentaiba, 1976).
- La majorité des cas résulte d'une contamination indirecte mise en évidence chez les personnes en contact avec les malades(Abu-Ali et al., 2009).
- EHEC peut se transmettre par contact direct ou indirect avec les animaux, leurs environnements ou leurs excréments (Wright et al, 2022).

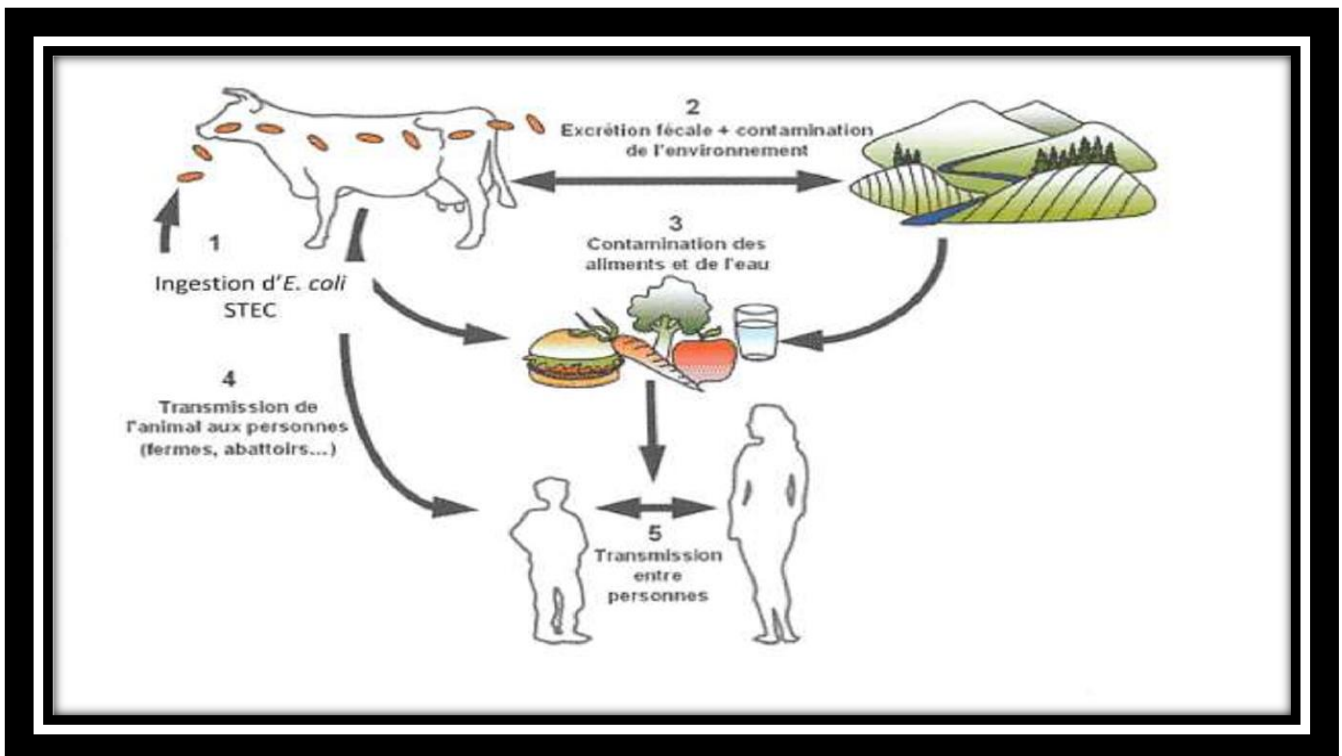


Figure 1:

Les voies de contamination par l'*Escherichia coli* Wikipédia

3.3.2 Pouvoir pathogène

Escherichia coli entérohémorragiques (*EHEC*) produit la Toxine Shiga, responsable de graves diarrhées sanglantes et des complications sévères telles que le syndrome hémolytique et urémiques, particulièrement chez les enfants et les personnes âgées.

Les bovins, et les végétaux crus contaminés, sont considérés comme la principale source d'infection humaine par *EHEC*(Germani & Le Bouguéneq, 2008).

Généralités sur la laitue

1. Définition

La laitue est une plante herbacée annuelle à croissance rapide, largement cultivée pour ses feuilles utilisées principalement en salade, ce qui en fait l'une des plantes les plus populaires à cet usage à travers le monde.

La Laitue, connu scientifiquement sous le nom de *Lactuca sativa* L., appartient au genre *Lactuca* et à l'espèce *sativa*. En Algérie, les variétés les plus cultivées se répartissent en trois types : la laitue à couper, la laitue pommée et la laitue Romaine (Melotto et al., 2020).

2. Origine de la laitue

La laitue aurait ses origines en Méditerranée et aurait été cultivée avant J.-C. Sa culture s'est ensuite étendue en Europe du Nord et en Amérique du Nord (O'Reilly & Plamondon, 2011)

Des vestiges de laitues ont également été découverts dans certaines tombes égyptiennes datant de 4500 ans avant notre ère (Labrie et Ménard, 2012).

Les premiers voyageurs ont introduit la laitue en Amérique à partir de 1494. À une exception près, toutes les laitues du continent proviennent donc de variétés européennes. *Lactuca canadensis* est la seule espèce indigène de laitue au Canada. Cependant, cette laitue présente une saveur amère et est rarement consommée (Breer & Schopfer, 1988).

3. Taxonomie

Classification de la laitue (Jin et al., 2023) :

- Règne : *Plantae*
- Famille : *Astéracées* ou *Composées*
- Genre : *Lactuca*
- Espèce : *Lactuca sativa*

- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : *Asterales*

4. Source de contamination de la laitue par les Entéropathogènes

a. Le sol

Les sols abritent une diversité de microorganismes bénéfiques ou pathogènes tels que *Salmonella*, *Listeria*, *Shigella* et *E. coli*, etc. Ces organismes peuvent être introduits directement par des cadavres d'animaux et des excréments, ou indirectement par les eaux de ruissellement et d'irrigation. Ils interagissent avec des systèmes biologiques antagonistes qui peuvent soit les combattre efficacement, soit être affectés par eux. Cette activité microbienne influence la santé des plantes, parfois de manière positive en produisant des antibiotiques utiles en médecine, mais aussi négative lorsque les bactéries acquièrent des gènes de résistance transférables sous l'effet de pressions environnementales telles que les effluents d'élevage ou les eaux usées traitées. Ces changements peuvent altérer les communautés microbiennes du sol de manière significative (Boa et al., 2020).

b. L'eau

Les eaux naturelles peuvent être affectées par des contaminations microbiologiques et chimiques, ce qui les rend potentiellement dangereuses en tant que vecteurs de nombreux agents pathogènes tels que des bactéries, des virus et des parasites. Elles peuvent également contenir des substances indésirables et des éléments toxiques, souvent issus des activités humaines plutôt que des particularités géologiques des environnements (Boa et al., 2020).

1 Cadre d'étude

Notre étude se concentre sur l'isolement des Entéropathogènes à partir de laitues prélevées dans les marchés et les fermes de la ville de Bejaia. Les méthodes d'isolement classiques ont été utilisées dans le laboratoire de Microbiologie de la Faculté (SNV) Université Abderrahmane Mira de Bejaïa. Cette recherche s'est déroulée du 4 mars au 18 mars 2024.

2 Matériel et Méthode

Les bactéries Entéropathogènes comprennent un très grand nombre de genres et d'espèces. Dans notre étude, nous avons concentré nos recherches sur trois types spécifiques : *Salmonella*, *Listeria* et *Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC)*.

2.1 Prélèvement

2.1.1 Lieu de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués à partir des échantillons de laitue provenant des marchés (elkseur, edimco, el Qouds,) ainsi que de laitue, eau et sol prélevés aléatoirement au niveau des fermes locales (AZMOUR, BACCARO, DJEBIRA) de la wilaya de Bejaia .



Figure 2:

Site de prélèvement du marché l'edimco « source :google map »



Figure 3: Site de prélèvements du marché El kseur

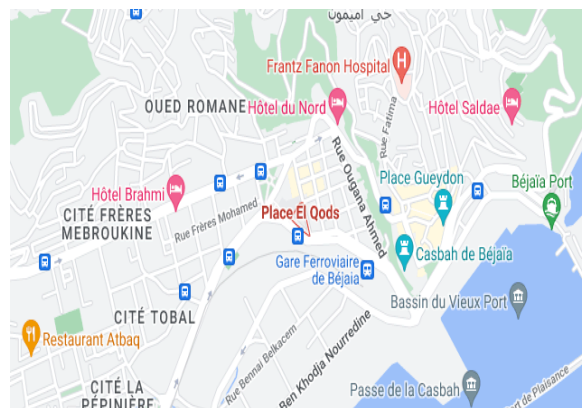


Figure 4: Sites de prélèvements ElQouds

2.1.2 Période de prélèvement

Trois sorties ont été effectuées à sept stations différentes à des moments distincts. Lors de ces sorties, des échantillons ont été prélevés : la laitue dans des sacs en plastique propres, l'eau dans des flacons stériles, et le sol dans des sacs de prélèvement aseptiques.

Tableau III: Périodes et sites des prélèvements

Périodes de prélèvement	Sites de prélèvement (Stations)
04-03-2024	Marché Edimco
	Marché El Kseur
	Ferme AZMOUR « Bensaid Abd allah »
	Ferme BACCARO « Bensaid Abdlaziz »
	Ferme AZMOUR « Dehas Ahcen »
11-03-2024	Marché Edimco
	Marché El Kseur
	Marché El Qouds
	Ferme AZMOUR « Bensaid Abd allah »
	Ferme AZMOUR « Dehas Ahcen »
18-03-2024	Marché Edimco
	Marché El Kseur
	Marché El Qouds
	Ferme AZMOUR « Dehas Ahcen »

	Ferme DJEBIRA « Âtman Cherif »
--	--------------------------------

2.1.3 Technique de prélèvement (Auclair et al., 1969)

- Utiliser des gants propres et désinfecter les mains avant de manipuler ;
- Utiliser des ciseaux ou un couteau stérilisé pour couper les laitues ;
- Placer les échantillons dans des sacs en plastique propres et des sacs de prélèvement aseptique ;
- Étiqueter chaque échantillon avec des informations telles que site, lieu, la date, l'heure, le vendeur, le nom de la ferme et d'autres détails pertinents ;

2.2 Echantillonnage :

La recherche a été menée sur un total de 49 échantillons de laitue. Parmi ceux-ci, 42 provenaient de différents marchés et sept 7 ont été collectés dans des fermes. En outre, 14 échantillons de sol et l'eau d'irrigation ont également été analysés.

2.2.1. Transport des échantillons

Les échantillons ont été prélevés de façon aseptique et transportés dans des conditions sécurisées au laboratoire de microbiologie.

2.3 Recherche des germes

Les germes recherchés dans la présente étude sont trois genres bactériens : *Salmonella*, *Listeria* et *Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC)*.

2.3.1 Pré-enrichissement, enrichissement, isolement et identification biochimique

Les bactéries Entéropathogènes ont été et isolées en utilisant diverses techniques microbiologiques courantes (Kraxberger et al., 2023). Tout d'abord, un pré-enrichissement a été réalisé pour récupérer les bactéries ayant subi un stress. Ensuite, un enrichissement sélectif a été employé pour favoriser la multiplication des bactéries par rapport à la flore compétitrice. Ce processus a été suivi d'un isolement sur des milieux sélectifs spécifiques afin d'obtenir une meilleure purification. Enfin, une identification biochimique (Wang et al., 2020).

❖ Pré-enrichissement

Le pré-enrichissement a pour objectif de revivifier les cellules afin de faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement (Guiraud. 2012).

Chaque échantillon a été mélangé avec de l'eau peptone tamponnée (EPT) puis incubés à une température de 37°C pendant 24 heures. :

- 25 g de laitue dans 225 ml d'eau peptonée.

- 1 g de sol dans 10 ml d'eau peptonée .
- 10 ml d'eau d'irrigation dans 90 ml d'eau peptonée.

❖ Enrichissement

L'enrichissement en vue de l'isolement s'effectue sur des milieux sélectifs,

- L'enrichissement des Salmonelles a été réalisé en transférant 1 ml du bouillon de pré-enrichissement dans un tube contenant 10 ml de bouillon Rappaport-Vassiliadis et incubé à 42°C pendant 24 heures dans un bain-marie agité.

- L'enrichissement de listeria a été effectué en prélevant 1 ml du bouillon de pré-enrichissement. Cette quantité a été inoculée dans 10 ml de bouillon Fraser demi-concentré additionné de supplément Fraser. Incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

- L'enrichissement d'*Escherichia coli entérohémorragiques* (EHEC) a été fait en prenant 1 ml du bouillon de pré-enrichissement et en le transférant dans 10 ml de bouillon lactosé avec novobiocine. Incubez à 42°C pendant 48 heures.

○ Isolement

La norme « AFNOR Agence Française de Normalisation NF U 47-100 de février 2005 » a été utilisée pour l'analyse microbiologique des *Salmonelles* et *Listeria*. De plus, la norme volontaire européenne et internationale « EN ISO 6579-1 » propose une méthode validée pour la recherche des salmonelles dans les aliments. Par ailleurs, l'isolement des souches d'*Escherichia coli* a été réalisé en respectant les directives de la norme « ISO 4832:1951 (F) ». (Maurin et al., 2019)

- *Salmonella*

Les échantillons enrichis ont été cultivés par la méthode des stries d'épuisement, où une goutte de culture d'enrichissement a étéensemencée sur le milieu sélectif XLD (xylose lysine désoxycholate) à partir de tous les prélèvements. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37°C pendant 48 heures. Les colonies suspectes ont été examinées (typiquement rouges avec un centre noir sur XLD, en raison de la production de sulfure d'hydrogène, pour les Salmonelles). Après 24 heures, les colonies isolées présentant les caractéristiques macroscopiques des Salmonella ont été repiquées sur des géloses MacConkey et mannitol pour une meilleure purification. (Catsaras & Le Minor, 1969)

- *Listeria*

Après avoirensemencé tous les prélèvements en stries sur la gélose sélective agar Palcam et incubé les boîtes à 37°C pendant 24-48 heures, les colonies suspectes sont

examinées. Les colonies de *Listeria monocytogenes* se présentent sous forme de colonies grises à noires avec des zones noires, indiquant l'hydrolyse de l'esculine sur l'agar Palcam.

Ensuite, les colonies suspectes sont transférées sur de la gélose mannitol et incubées à 37°C pendant 24-48 heures. Après cette période, celles présentant les caractéristiques macroscopiques typiques de *Listeria* sont identifiées et étudiées (Audurier et al., 1977)

- *EHEC*

Les échantillons ont été cultivés en stries sur des milieux sélectifs comme l'agar MacConkey avec sorbitol (SMAC), puis incubez les boîtes à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies suspectes, généralement incolores ou transparentes sur le SMAC car elles ne fermentent pas le sorbitol. Ont été transférées sur une gélose TSA et incubez à 37°C pendant 24 à 48 heures. les colonies présentant les caractéristiques macroscopiques typiques des *EHEC* ont ensuite été identifiées et analysées (Dadié et al., 2000).

❖ Examen phénotypique

La caractérisation initiale des colonies peut être effectuée en observant leur aspect macroscopique, ce qui permet d'orienter les résultats lors de l'identification.

Selon « Joffin et Leyral, 2001 » les critères d'identification macroscopiques comprennent :

- la configuration des colonies : irrégulières, rondes, etc...
- la mesure du diamètre des colonies pour déterminer leur taille.
- la couleur du territoire.
- la croissance : convexe, concave, plate.
- la transparence : opaque, translucide ou transparente.
- la surface peut être lisse, rugueuse, sèche, dentelée... etc.

❖ Examen microscopique

La coloration Gram (Annexe 1) permet d'améliorer le contraste des bactéries afin de les observer de manière plus claire au microscope, en déterminant la forme, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées et de différencier entre les deux groupes bactériens (G+) et (G-).

❖ Identification biochimique

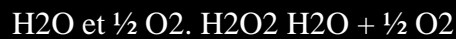
L'identification des souches de salmonelles fait appel à une sélection biochimiques des isolats analysés, en fonction de réactions biochimiques déterminantes, et à une identification sérologique.

a. Test oxydase

Le test de recherche de l'oxydase est crucial pour l'identification des bacilles à Gram négatif; ce test permet de mettre en évidence une enzyme : la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine. Ce réactif est incolore et en présence de l'enzyme, il libère un composé rose-rouge, noircissant à l'air. phénylène diamine oxydase réactif incolore composé rose violacé.

b. Test catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), produit toxique du métabolisme aérobie de nombreuses bactéries, en eau et oxygène ; une effervescence indique une réaction positive(**Tankeshwar, 2013d**).



- si des bulles de dioxygène se forment, la bactérie possède la catalase ;
- si rien n'est observable, la bactérie ne possède pas l'enzyme.

c. Test citrate de Simmons

Le test est réalisé à l'aide du milieu citrate de Simmons, qui utilise le bleu de bromothymol comme indicateur de pH et le citrate comme unique source de carbone. L'enzyme citrase hydrolyse le citrate en acide oxaloacétique et en acide acétique. L'acide oxaloacétique est ensuite hydrolysé en acide pyruvique et CO₂. Si du CO₂ -est produit, il réagit avec les composants du milieu pour former un composé alcalin, tel que Na₂CO₃. Ce changement alcalin est indiqué par une modification de la couleur du milieu, grâce au bleu de bromothymol.

La pente du milieu estensemencée avec des stries et incubée à une température de 37°C pendant 18 heures. Seules les bactéries capables d'utiliser le citrate peuvent se développer sur ce milieu en l'alcalinisant. Ce processus d'alcalinisation se manifeste par une transition de la couleur du milieu vers le bleu. (**Tankeshwar, 2013a**).

d. Fermentation des sucres : milieu triple sucres TSI

Ce milieu permet d'analyser la fermentation de trois sucres (glucose, lactose, saccharose), d'évaluer la production ou non d'H₂S et de mesurer la production ou non de gaz à partir du glucose. **(Dellarras C. 2007).**

La technique consiste à ensemencer le culot par piqûre puis la pente de la gélose par stries serrées, la lecture se fait après 18h d'incubation à 37°C.

Lorsque l'un des glucides est fermenté, la baisse du **pH** fera passer le milieu de l'orange rougeâtre (la couleur originale) au jaune.

- Une couleur rouge foncé indique une alcalinisation des peptones.

-Le thiosulfate de sodium dans le milieu est réduit par certaines bactéries en sulfure d'hydrogène (H₂S), ce dernier réagit avec les ions ferriques dans le milieu pour produire du sulfure de fer, un précipité insoluble noir.

- Fermentation de glucose : Culot rouge Glucose (-)

: Culot jaune Glucose (+)

- Fermentation du lactose : pente rouge : lactose (-)

- Fermentation de saccharose : pente rouge : saccharose (-)

- Production de gaz : apparition de bulles de gaz dans le culot.

- Formation de H₂S : production d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqure **(Tankeshwar, 2013b).**

e. Test MR VP

Les tests de méthyle rouge et de Voges-Proskauer font partie d'une batterie de tests biochimiques appelée IMViC utilisée en laboratoire clinique

- Inoculer un tube de bouillon MR-VP à partir d'une culture fraîche pure cultivée sur gélose trypticase soja TSA puis incubé à 37°C (18 à 24 heures) pour favoriser la fermentation des glucides par les bactéries. Ensuite, diviser le contenu du tube en deux parties égales dans deux tubes stériles.

Test MR : Ajouter une goutte de réactif rouge de méthyle. Observer la teinte du bouillon. Un résultat positif (acide) se manifeste par une transition vers le rouge ($\text{pH} \leq 4$). Un résultat négatif (non acide) reste jaune ou orange ($\text{pH} > 4,4$).

Test VP : Ajouter 6 gouttes de solution d'alpha-naphtol (solution VP1) et 2 gouttes de solution de KOH à 40% (solution VP2) dans le tube. Mélanger délicatement par inversion. Laisser à température ambiante pendant 5 à 15 minutes. Un résultat positif est indiqué par l'apparition d'une teinte rose ou rouge, conséquence de la formation d'acétoïne (Tankeshwar, 2014).

f. Test urée /Indole/ tryptophane

Le milieu **Urée Indole** permet la mise en évidence l'**uréase**, la **tryptophane** désaminase et la production d'**indole**. La suspension bactérienne est ensemencée dans un milieu Urée-Indole, puis incubée à 37°C pendant 24 heures.

Les bactéries possédant une uréase transforment l'urée en carbonate d'ammonium entraînant une alcalinisation qui provoque une coloration rouge violacé du milieu en présence de rouge de phénol (indicateur de pH). La production d'indole est mise en évidence par l'addition de deux gouttes de réactif de Kovacs qui réagit avec l'indole pour donner une coloration rouge dans la partie supérieure du milieu en cas de réaction positive. La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition ajouter une goutte de réactif TDA ; une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive (Tankeshwar, 2013b, Cassiana et al .2020).

g. Assimilation des sucres

Les sucres étudiés sont : Xylose et Rhamnose.

La recherche du profil de fermentation des sucres est réalisée dans le milieu MEVAG (milieu d'Etude de la voie d'Attaque des glucides)

Les tubes de MEVAG sont fondus au bain-marie, puis refroidis à une température de 45 à 50°C. Ensuite, quelques gouttes de la solution aqueuse stérile du sucre à étudier, « Rhamnose et Xylose » (7 gouttes d'une solution à 30% pour obtenir une concentration finale de 1%), sont ajoutées de manière aseptique. Le milieu est mélangé, refroidi, puis inoculé par piqûre centrale et incubé à une température de 37°C pendant 24 heures. Après cette période

d'incubation, un changement de couleur du milieu en jaune indique une réaction positive, tandis que si le milieu reste rouge, la réaction est négative.

h. Test d'hémolyse

L'hémolysine est une toxine cruciale pour la virulence de *Listeria*. Le test d'hémolyse sur gélose au sang est un critère de sélection très important en milieu clinique. Pour cela, nous avons ensemencé la gélose au sang en strie. Après une incubation de 24 à 48 heures à 37°C, nous avons examiné les géloses sous une lumière intense : *L. monocytogenes* et *L. seeligeri* montrent une légère zone d'hémolyse autour du point de piqûre, tandis que *L. ivanovii* présente une zone d'hémolyse nette et très prononcée, parfois multiple. Les autres espèces de *Listeria* ne génèrent pas de zone d'hémolyse observable dans ce test(**Tankeshwar, 2013c**).

i. Recherche de lécithinase

La gélose au jaune d'œuf de Baird Parker est un milieu de culture enrichi et différencié employé pour isoler et distinguer diverses espèces en fonction de leur capacité présumée à dégrader la lécithine(**Embarek, 1994**)

Inoculez une colonie de la souche à tester en une ligne droite sur la gélose. Incubez la boîte à 37 °C pendant 48 heures. Observez la boîte pour détecter la présence d'un halo opaque autour de la culture.

Au total, 63 échantillons ont été collectés, dont 49 de laitues, 7 d'eau et 7 de sols, provenant de 3 marchés et 4 fermes.

Une fois le pré-enrichissement et l'enrichissement réalisé, les échantillons ont été isolés sur des milieux sélectifs. Les souches présentant des caractéristiques morphologiques des 3 genres recherchés sont ensuite purifiées par des repiquages successifs sur le même milieu d'isolement puis soumises à des tests d'identification.

Examen macroscopique

1. Milieu XLD

Les colonies appartenant aux *salmonella* apparaissent rouges à centre noir. Le rouge due à la fermentation de xylose, tandis que le noir est causé par la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) via la réduction du citrate ferrique ammoniacal.

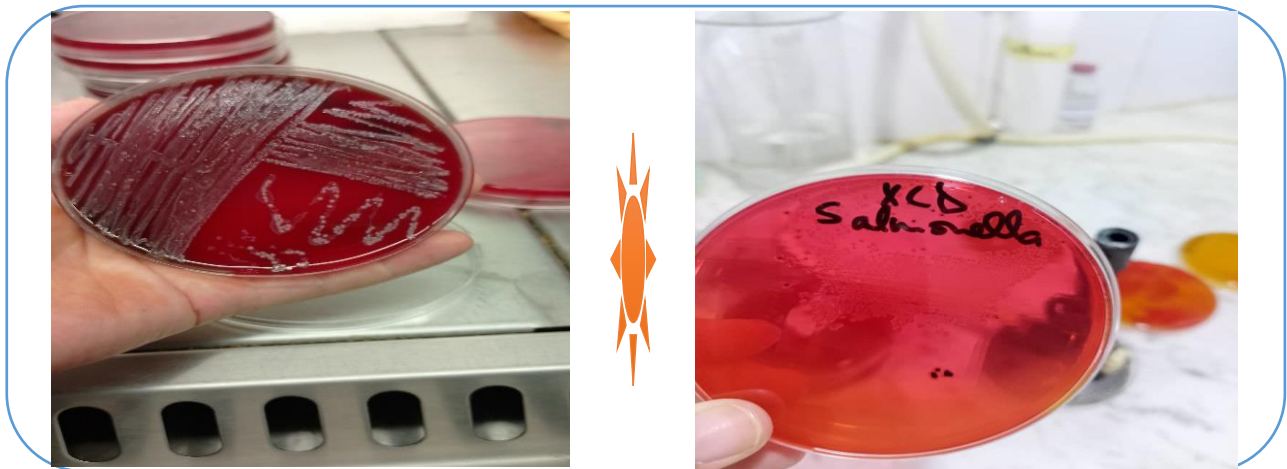


Figure :5

Aspect des *Salmonelles* sur gélose XLD

2. Milieu Palcam

Les colonies appartenant au genre *Listeria* se présentent sous forme des colonies grises à noires avec des zones noires.



Figure :6

Aspect de *Listeria* sur gélo

3. Milieu Mac-Conky Sorbitol (SMAC)

Sur Mac-Conky Sorbitol, on observe chez l'espèce *E.coli* des colonies incolores ou transparentes en raison de l'absence de la fermentation du sorbitol.

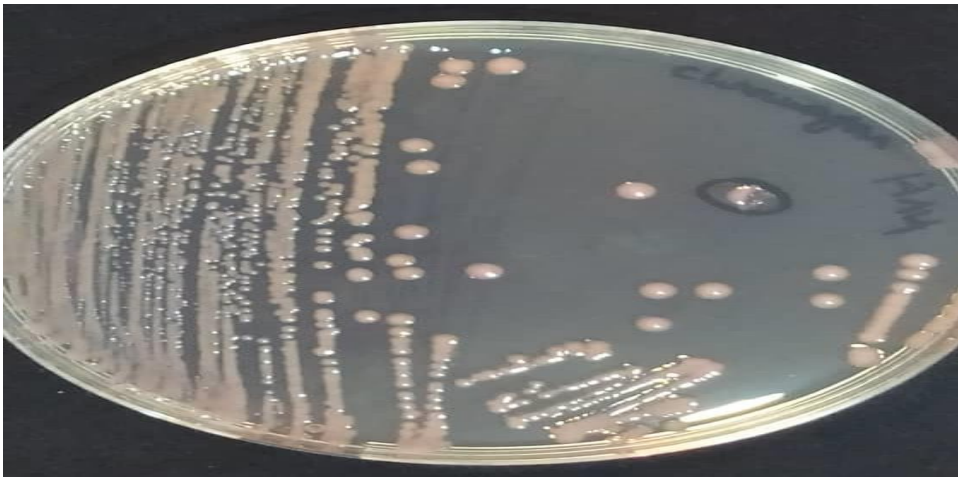


Figure :7

Aspect des colonies EHEC sur Mac-Conky Sorbitol

Résultats et discussion

Après avoir éliminé les souches négatives nous avons réalisé une étude biochimique des résultats.

Tableau IV: résultats d'isolement des souches suspectes dans les milieux des cultures sélectifs.

Souche	XLD	Mac Conk Sor	Palcam	TSA	Mannitol
L1	-	-	-	-	-
L3	-	-	-	-	-
L7	+/-	+/-	-	-	-
L11	+/-	+/-	-	-	-
L12	-	-	-	-	-
L13	-	-	-	+/-	-
L15	-	-	-	+/-	-
L20	-	-	+/-	-	+/-
L23	-	-	+/-	-	+/-
L24	-	-	+/-	-	-
L29	+/-	-	+/-	-	-
L32	-	-	-	+/-	-
L34	-	-	-	-	-
L35	-	-	-	+/-	-
L36	-	-	-	+/-	-
L39	+/-	-	-	-	-
L40	-	-	-	-	-
L43	+/-	-	-	-	-
L44	-	-	+/-	-	+/-
L48	-	-	+/-	-	+/-
L49	-	-	+/-	-	+/-
S1	+/-	+/-	-	-	-
S3	+/-	+/-	-	-	-
S6	+/-	-	-	-	-
S7	+/-	-	-	-	-
e 2	-	-	-	+/-	-
e 3	+/-	-	-	-	-

I. Examen microscopique

Une Coloration de Gram, nous a permis d'observer différentes bactéries à Gram positif avec un aspect bacilles colorés en violet.

II. L'identification biochimique

1. Test catalase

L'apparence de l'effervescence est observée seulement pour deux souches parmi toutes les souches testées dès leur contact avec l'eau oxygénée (catalase positif). Le (Tableau V) résume les résultats obtenus



Figure :8

Résultats du test catalase

2. Test oxydase

Les disques d'oxydase restent toujours incolores après ajout de la suspension bactérien, révélant ainsi un résultat négatif. Pour toute les souches testées. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus



Figure :9

Résultats du test oxydase

3. Test citrate de Simmons

Cs positive: coloration de milieu en bleu.

Cs négative: le milieu reste vert après incubation.

Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

4. Recherche d'utilisation du glucose, du lactose, de la production de gaz et H₂S sur TSI

Après incubation du milieu, nos souches ont présenté différents aspects. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

5. Test MR-VP

- La voie des acides mixtes est mise en évidence après ajout du réactif de RM dans le milieu. Une coloration rouge indiquée un résultat RM+, ce qui correspond à une fermentation acide mixte. Un résultat négatif est indiqué par une coloration jaune. La plupart des colonies testées étaient RM+. Cependant quelques-unes étaient RM-

La voie du butylène glycolique est mise en évidence après l'ajout des réactifs VP I et VP II. Une coloration rouge indique un résultat VP+, tandis qu'une absence de coloration rouge indique une réaction négative. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

6. Test indole, Urée, TDA

- La présence de l'uréase se traduit par virage au rouge du milieu urée-indole. Certaines souches sont uréase positive (coloration rouge), tandis que d'autres sont uréase négatives (uréase -).

- La présence de l'indole est révélée après ajout du réactif de Kovacs dans le milieu urée-indole. La formation d'un anneau rouge indique sa présence, tandis qu'un anneau jaune indique son absence.

- La TDA est mise en évidence après ajout du réactif de la TDA. Une coloration rouge brun témoigne de la désamination du tryptophane. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

7. Assimilation des sucres

Les sucres étudiés et utilisés sont : xylose et Rhamnose sur le milieu MEVAG.

Un changement de couleur du milieu en jaune indique une réaction **positive**, tandis que si le milieu reste rouge, la réaction est négative.

Les colonies testées ont montré une réaction négative pour la Xylose et positive pour le Rhamnose.

Les colonies suspectes d'EHEC ont été éliminées. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

8. Teste d'hémolyse

Les colonies suspectes isolées sur gélose au sang, montrent une légère zone d'hémolyse autour du point d'ensemencement. . Le (Tableau V) résume les résultats obtenus



Figure: 10

Aspect d'hémolyse sur gélose au sang

9. Recherche de Lécithinase

Les colonies suspectes ont été isolées sur gélose Baird Parker au jaune d'œuf. .toute les résultats sont négatifs. Le (Tableau V) résume les résultats obtenus

Test négatif : absence de zone blanche opaque s'étendant à partir du bord de la colonie.

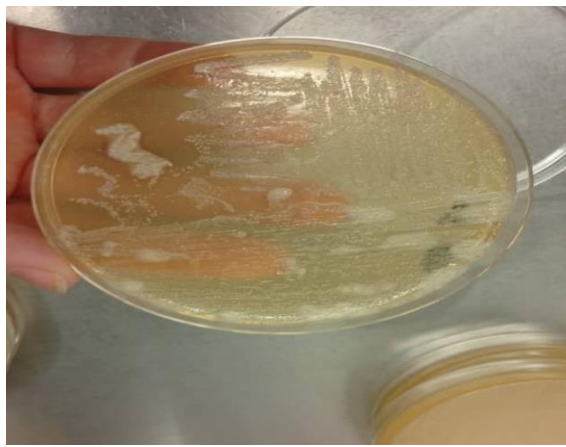


Figure :11

Aspect des colonies positive sur baird parker

Résultats et discussion

Tableau V : Résultats d'identification biochimiques de *Listeria*

Souche	Catalase	Oxydase	MR	VP	Uréase	IND	TDA	Lactose	Sacharose	Glucose	Citrate	H ₂ S/ Gaz	Hemolyse	lécithinase
L20	+	-	-	+	+	+/-	-	+	-	+	+	-	-	-
L23	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
L29	+	-	-	+	+	+/-	-	+	+	+	-	-	-	-
L32	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
L36	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
L39	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
L40	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-
L43	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
L4	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
L48	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+
L49	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-

Discussions

Dans notre étude, la section pratique a examiné deux stations : une ferme et un marché, en prélevant des échantillons de laitue, d'eau et de sol, l'objectif était de détecter la présence de *Salmonella*, de *Listeria* et d'*EHEC*.

1. Identification des salmonelles :

Les colonies suspectes sur les milieux sélectifs ont été observées au microscope après coloration de Gram. Des bacilles Gram Négative ont été identifiés, puis ils ont été soumis à une série de tests biochimiques : test de catalase, test d'oxydase, et d'autres tests discriminatifs pour le genre *Salmonella*, incluant : test uréase +, utilisation du citrate -, fermentation des sucres (glucose+, lactose-, saccharose) +, absence de production de H₂S, et test de mobilité-.

Tous les résultats de ces tests sont négatifs et aucune trace de *Salmonella* n'a été détectée.

2. Identification des EHEC :

Les milieux d'isolement spécifiques SMAC, TSA ont présenté une sélectivité plus ou moins efficace qui a permis à nombreuses d'autres colonies de croître mais non pas *EHEC*.

En plus des tests biochimique spécifique à ce genre ont été effectuer : catalase -, oxydase+..., Rhamnose +, Xylose-, utilisation de citrate- et coloration de Gram nous a montrer des bacilles Gram positive ce qui a confirmer que toute les souche *EHEC* sont éliminer .

Aucune *E.coli* n'a été obtenus

Des faux négatifs peuvent parfois survenir en raison de divers facteurs, tels que des techniques de prélèvement inadéquates ou des seuils de détection insuffisants. Les *EHEC* peuvent être présents en quantités faibles dans un échantillon, nécessitant des méthodes sensibles pour la détection.



Figure :12

Résultat de test citrate de simmons

Figure :13

résu

3. Identification des *Listeria* :

L'utilisation de milieux d'isolement spécifiques tels que la gélose Palcam et la gélose mannitol a montré une sélectivité variable, permettant la croissance de nombreuses colonies suspectes ainsi que d'autres colonies diverses. Ces milieux ont été utilisés pour l'isolement des colonies présumées, dont la plupart se sont avérées être des bactéries non sporulées, immobiles et catalase positives.

Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des souches présumptives montrent que la majorité des colonies testées étaient oxydase négatives, catalase positives, et la coloration de Gram a montré la présence de bacilles Gram positifs. Ces tests sont essentiels pour orienter le diagnostic et classifier les souches au sein de la famille des *Listeriaceae*.

Ces tests nous ont permis de sélectionner deux souches présumptives dont l'identification a révélé comme hémolyse sur la gélose au sang et Apparition d'une zone blanche, opaque et diffuse qui s'étend dans le milieu entourant les colonies sur gélose Baird Parker additionné de jaune d'œuf pour la détection de la lécithinase.

Enfin comme comparaison des résultats, on estime que la contamination de la laitue par les bactéries entéropathogènes est plus significative aux marchés que dans les fermes.

Ainsi l'absence de ces germes pourrait s'expliquer par un certain nombre d'hypothèses :

- Les tests utilisés pour détecter la présence de salmonelle peuvent présenter des limites quant à leur sensibilité. Cela implique qu'ils pourraient être incapables de détecter de faibles niveaux de salmonelle, ce qui pourrait entraîner un résultat négatif même si la bactérie est réellement présente.
- Les tests reposent généralement sur des échantillons prélevés dans un sac particulier de laitue.
- La représentativité des résultats peut être affectée par des limitations dans la taille de l'échantillon ou dans la façon dont il est prélevé.
- Les niveaux de salmonelle peuvent différer d'un échantillon à l'autre en raison de divers facteurs tels que les conditions de croissance, les méthodes agricoles et le mode de transport. Un résultat négatif dans un échantillon particulier ne signifie pas qu'il n'y a pas de salmonelle dans l'échantillon.
- Les faux négatifs peuvent parfois survenir en raison de divers facteurs, tels que des techniques de prélèvement inadéquates ou des seuils de détection insuffisants.
- Les résultats de l'identification biochimique par la galerie classique des souches présomptives montrent qu'elles sont des bacilles à Gram négatif, oxydase négative, catalase positive avec des variations concernant la mobilité, l'utilisation des sucres (dont particulièrement le lactose) et les caractères : indole, rouge de méthyle, Voges-Proskauer, citrate.

CONCLUSION

Cette étude réalisée sur la laitue provenant de trois marchés et de laitue , eau et sol de quatre fermes locales a montré que, quel que soit le site de prélèvement, les charges microbiennes sont bas. Les résultats indiquent une contamination aussi significative par des entéropathogènes dans les marchés par rapport aux fermes.

L'objectif de cette étude était d'isoler et de caractériser les bactéries entéropathogènes dans la laitue. Au cours de cette étude, nous avons caractériser deux souches de *Listeria* à partir de 63 échantillons (laitue, eau et sol). La caractérisation des isolats a été réalisée par des méthodes bactériologiques et biochimiques.

À l'avenir, il serait intéressant d'approfondir les études sur la recherche des bactéries entéropathogènes. En termes de recommandations et perspectives :

- Prendre en considération les résultats de cette étude pour améliorer les paramètres biochimiques de la laitue.
- Compléter notre étude préliminaire par :
 - ✓ Une étude plus approfondie nécessitant un plus grand nombre d'échantillons et plus de variétés de laitue provenant de divers endroits.
 - ✓ Une étude épidémiologique des souches afin de déterminer la source de contamination.
 - ✓ Le suivi et l'amélioration des pratiques culturales.
 - ✓ Une étude moléculaire (PCR).

A

Abu-Ali, G. S., Lacher, D. W., Wick, L. M., Qi, W., & Whittam, T. S. (2009). Genomic diversity of pathogenic *Escherichia coli* of the EHEC 2 clonal complex. *BMC Genomics*, *10*, 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-296>

Auclair, J., Thomas, G., Cheftel, H., Hermier, J., Darolle, C., Rotereau, J. C., Desez, A., Sainclivier, M., Eck, A., & Veillet, A. (1969). [Methods for sampling and verifying dairy products with a view to their microbiological analysis]. *Annales De La Nutrition Et De L'alimentation*, *23*(3), A5-25.

Audurier, A., Rocourt, J., & Courtieu, A. L. (1977). [Isolation and characterization of « *Listeria monocytogenes* » bacteriophages (author's transl)]. *Annales De Microbiologie*, *128*(2), 185- 198.

B

Berche, P. (1995). Physiopathologie des infections à *Listeria monocytogenes*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *25*, 197- 209. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(05\)81057-1](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(05)81057-1)

Billah, M. M., & Rahman, M. S. (2024). *Salmonella* in the environment : A review on ecology, antimicrobial resistance, seafood contaminations, and human health implications. *Journal of Hazardous Materials Advances*, *13*, 100407. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100407>

Boa, É., Danielsen, S., & Haesen, S. (2020). Chapitre 22 - Plus forts ensemble : Identifier les avantages d'une intégration plus étroite entre la santé des végétaux, l'agriculture et One Health. In J. Zinsstag, E. Schelling, D. Waltner-Toews, M. A. Whittaker, & M. Tanner (Éds.), *One health, une seule santé : Théorie et pratique des approches intégrées de la santé* (p. 349- 366). Éditions Quæ. <https://books.openedition.org/quæ/36240>

Breer, C., & Schopfer, K. (1988). *Listeria* and food. *Lancet (London, England)*, *2*(8618), 1022. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)90775-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)90775-1)

Buntain, B., Allen-Scott, L., North, M., Rock, M., & Hatfield, J. (2020). Chapitre 28— Favoriser un environnement universitaire propice à One Health. In J. Zinsstag, E. Schelling, D. Waltner-Toews, M. A. Whittaker, & M. Tanner (Éds.), *One health, une seule santé : Théorie et pratique des approches intégrées de la santé* (p. 453- 472). Éditions Quæ. <https://books.openedition.org/quæ/36385>

C

Catsaras, M., & Le Minor, L. (1969). [Isolation of Salmonella lille in France and in the world]. *Annales De l'Institut Pasteur De Lille*, 20, 155- 158.

Ceuppens, S., Hessel, C. T., de Quadros Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E. C., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 67- 76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>

Chiaretti, G., Onorati, F., Borrello, P., Orasi, A., & Mugnai, C. (2014). Coastal microbial quality of surface sediments in different environments along the Italian coast. *Environmental Science. Processes & Impacts*, 16(9), 2165- 2171. <https://doi.org/10.1039/c4em00225c>

D

Dadié, A., Karou, T., Adom, N., Kétté, A., & Dosso, M. (2000). [Isolation of enteric pathogenic agents in Côte d'Ivoire : Escherichia coli O157:H7 and enteroaggregative E. coli]. *Bulletin De La Societe De Pathologie Exotique (1990)*, 93(2), 95- 96.

E

Embarek, P. K. B. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods : A review. *International Journal of Food Microbiology*, 23(1), 17- 34. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90219-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90219-4)

G

Germani, Y., & Le Bouguéneq, C. (2008). Diagnostic des *Escherichia coli* agents de diarrhée chez l'homme. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2008(400), 67- 76. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(08\)80102-5](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(08)80102-5)

H

Heaton, J. C., & Jones, K. (2008). Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere : A review. *Journal of Applied Microbiology*, 104(3), 613- 626. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>

I

Ilic, S., Moodispaw, M. R., Madden, L. V., & Lewis Ivey, M. L. (2022). Lettuce Contamination and Survival of *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in Hydroponic Nutrient Film Technique Systems. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(21), 3508. <https://doi.org/10.3390/foods11213508>

J

Janda, J. M. (2016). Taxonomic update on proposed nomenclature and classification changes for bacteria of medical importance, 2015. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *86*(2), 123- 127. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.021>

Jin, X., Jiao, H., Zhang, C., Li, M., Zhao, B., Liu, G., & Ji, J. (2023). Hydroponic lettuce defective leaves identification based on improved YOLOv5s. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1242337. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1242337>

K

Kraxberger, K., Antonielli, L., Kostić, T., Reichenauer, T., & Sessitsch, A. (2023). Diverse bacteria colonizing leaves and the rhizosphere of lettuce degrade azoxystrobin. *The Science of the Total Environment*, *891*, 164375. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164375>

L

Landstorfer, R., Simon, S., Schober, S., Keim, D., Scherer, S., & Neuhaus, K. (2014). Comparison of strand-specific transcriptomes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 (EHEC) under eleven different environmental conditions including radish sprouts and cattle feces. *BMC Genomics*, *15*, 353. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-353>

Le Minor, L. (1992). Taxonomie et nomenclature des *Salmonella*. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *22*, 246- 248. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(05\)80128-3](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(05)80128-3)

Loiseau-Marolleau, M. L., & Bentaiba, Z. N. (1976). A propos d'une contamination infra-clinique à *Escherichia coli* non entéropathogène : Intérêt épidémiologique de la sérotypie. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *6*(9), 319- 322. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(76\)80059-5](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(76)80059-5)

M

Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J.-P., & Touati, A. (2018). OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(4), 587- 604. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>

Maurin, A., Petit, A., Tilleul, P., & Combeau, D. (2019). [ISO 9001 certification of a sterilization unit: Transition to the 2015 version]. *Annales Pharmaceutiques Francaises*, 77(5), 363- 373. <https://doi.org/10.1016/j.pharma.2019.05.002>

Mazaheri, S., Salmanzadeh-Ahrabi, S., Falsafi, T., & Aslani, M.-M. (2014). Isolation of Enteropathogenic Escherichia coli from lettuce samples in Tehran. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 7(1), 38- 42.

Melotto, M., Brandl, M. T., Jacob, C., Jay-Russell, M. T., Micallef, S. A., Warburton, M. L., & Van Deynze, A. (2020). Breeding Crops for Enhanced Food Safety. *Frontiers in Plant Science*, 11, 428. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00428>

Mogren, L., Windstam, S., Boqvist, S., Vågsholm, I., Söderqvist, K., Rosberg, A. K., Lindén, J., Mulaosmanovic, E., Karlsson, M., Uhlig, E., Håkansson, Å., & Alsanus, B. (2018). The Hurdle Approach-A Holistic Concept for Controlling Food Safety Risks Associated With Pathogenic Bacterial Contamination of Leafy Green Vegetables. A Review. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01965>

O

Olaimat, A. N., & Holley, R. A. (2012). Factors influencing the microbial safety of fresh produce : A review. *Food Microbiology*, 32(1), 1- 19. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.04.016>

O'Reilly, C., & Plamondon, R. (2011). Impact of the principal stroke risk factors on human movements. *Human Movement Science*, 30(4), 792- 806. <https://doi.org/10.1016/j.humov.2010.07.010>

R

Rahman, M., Alam, M.-U., Luies, S. K., Kamal, A., Ferdous, S., Lin, A., Sharior, F., Khan, R., Rahman, Z., Parvez, S. M., Amin, N., Hasan, R., Tadesse, B. T., Taneja, N., Islam, M. A.,

& Ercumen, A. (2021). Contamination of Fresh Produce with Antibiotic-Resistant Bacteria and Associated Risks to Human Health: A Scoping Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(1), 360. <https://doi.org/10.3390/ijerph19010360>

Rocourt, J. (1988). Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection*, 16 Suppl 2, S89-91. <https://doi.org/10.1007/BF01639728>

Rocourt, J., & Seeliger, H. P. R. (1985). Distribution des espèces du genre *Listeria*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 259(3), 317- 330. [https://doi.org/10.1016/S0176-6724\(85\)80034-1](https://doi.org/10.1016/S0176-6724(85)80034-1)

Romagnoli, P. A., Fu, H. H., Qiu, Z., Khairallah, C., Pham, Q. M., Puddington, L., Khanna, K. M., Lefrançois, L., & Sheridan, B. S. (2017). Differentiation of distinct long-lived memory CD4 T cells in intestinal tissues after oral *Listeria monocytogenes* infection. *Mucosal Immunology*, 10(2), 520- 530. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.66>

S

Schlech, W. F. (1984). New perspectives on the gastrointestinal mode of transmission in invasive *Listeria monocytogenes* infection. *Clinical and Investigative Medicine. Medecine Clinique Et Experimentale*, 7(4), 321- 324.

Shaheen, M. N. F. (2022). The concept of one health applied to the problem of zoonotic diseases. *Reviews in Medical Virology*, 32(4), e2326. <https://doi.org/10.1002/rmv.2326>

T

Tankeshwar, A. (2013a, mai 17). *Citrate Utilization Test : Principle, Procedure, Results* • *Microbe Online*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/citrate-utilization-test/>

Tankeshwar, A. (2013b, juillet 16). *Triple Sugar Iron (TSI) Agar : Principle, Results, and Interpretation*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/triple-sugar-iron-agar-tsi-principle-procedure-and-interpretation/>

Tankeshwar, A. (2013c, août 22). *Blood Agar and Types of Hemolysis* • *Microbe Online*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/blood-agar-composition-preparation-uses-and-types-of-hemolysis/>

Tankeshwar, A. (2013d, octobre 7). *Catalase test : Principle, Procedure, Results, Uses* • *Microbe Online*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/catalase-test-principle-uses-procedure-results/>

W

Wang, T., Wang, S., Tang, X., Fan, X., Yang, S., Yao, L., Li, Y., & Han, H. (2020). Isolation of urease-producing bacteria and their effects on reducing Cd and Pb accumulation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(8), 8707- 8718. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06957-3>

Y

Yeh, E., Pinsky, B. A., Banaei, N., & Baron, E. J. (2009). Hair sheep blood, citrated or defibrinated, fulfills all requirements of blood agar for diagnostic microbiology laboratory tests. *PloS One*, 4(7), e6141. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006141>

Youté, O. D., Domngang Noche, C., Tamatcho Kweyang, B. P., Kougang, E. G., & Fotsing Kwetche, P. R. (2024). Surface decontamination effectiveness at the “Université des Montagnes” Teaching Hospital : Monitoring in the biomedical analysis laboratory. *Heliyon*, 10(4), e25647. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25647>

Yue, M., & Schifferli, D. M. (2014). Allelic variation in *Salmonella* : An underappreciated driver of adaptation and virulence. *Frontiers in Microbiology*, 4, 419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00419>

Z

Zorrig, W. (2011). *Recherche et caractérisation de déterminants contrôlant l'accumulation de cadmium chez la laitue « Lactuca sativa »*. Thèse de Doctorat—Walid ZORRIG - SupAgro Montpellier—FST.

Annexes

ANNEXE 1 : Coloration de Gram

1. Prélèvement

- A partir d'une culture liquide : prélever un aliquote de suspension à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu
- A partir d'un milieu solide : réaliser une suspension en eau physiologique à partir d'une culture jeune et prélever un aliquote de suspension à l'anse de platine (ou à la pipette stérile)
- A partir de produits alimentaires ou biologiques : prélever un aliquote du produit (dilué ou non) à l'anse (ou à la pipette stérile) après avoir homogénéisée le milieu

2. Réalisation du frottis

Etaler sur 1 à 2 cm par un mouvement circulaire en partant du centre de la lame.

Le frottis réalisé doit être :

- MINCE et HOMOGENE, étendu sur la lame sans toucher les bords
- Réalisé sur une lame propre et dégraissée, une goutte d'eau déposée en surface doit s'y étaler complètement.

3. Séchage

- À la température du laboratoire, si possible
- Ou bien à chaleur douce : platine chauffante à 37° ou au-dessus de la veilleuse du bec bunsen, à hauteur suffisante. **NE JAMAIS CHAUFFER BRUTALEMENT**

4. Fixation

But : tuer les bactéries, fixer leur structure cytologique, et les faire

adhérer à la lame. x Fixation par la chaleur :

- À utiliser seulement pour les frottis effectués à partir de cultures bactériennes
- Passer la lame-frottis situé sur le dessus dans la flamme chauffante,

LENTEMENT et 3 à 4 fois de suite (attention de bien tenir la lame avec une pince) et laisser refroidir. x Fixation par l'alcool : employé quel que soit le produit traité.

Recouvrir la lame pendant 5 min avec de l'alcool puis rincer à l'eau déminéralisé et égoutter le frottis avant coloration.

5. Coloration

Principe: La coloration permet de distinguer les bactéries GRAM + des GRAM – grâce à leurs différences de nature de paroi.

ETAPES	MODE OPERATOIRE	TEMPS	PRINCIPE
COLORATION PRIMAIRE	<ul style="list-style-type: none"> - Recouvrir la lame de cristal violet ou violet de gentiane - Rincer à l'eau distillée et récupérer le cristal violet dans un bêcher (ne pas le jeter dans le bac à coloration) 	1 minute	Le colorant violet pénètre dans les cellules bactériennes
MORDANÇAGE	<ul style="list-style-type: none"> - Recouvrir de Lugol - Rincer à l'eau distillée et l'égoutter 	1 minute	Il se forme un complexe chimique entre le violet et le Lugol qui fixe le violet et colore le cytoplasme de toutes les bactéries en violet.

<p>DECOLORATION</p>	<p>-Tenir la lame inclinée et faire couler pendant quelques secondes de l'alcool à 95° jusqu'à écoulement incolore.</p> <p>- Rincer immédiatement à l'eau distillée et égoutter</p>	<p>5 secondes environ</p>	<p>L'alcool dissout le violet de gentiane, si la paroi bactérienne est perméable à l'alcool (les lipides sont dissous par l'alcool), celui-ci pénètre dans les bactéries et décolore leur cytoplasme : les bactéries deviennent incolores. Si les bactéries ont une paroi imperméable à l'alcool</p>
			<p>(épaisse et sans lipides), elles restent colorées en violet et elles sont dites GRAM + ou positif.</p>
<p>COLORATION SECONDAIRE</p>	<p>- Recouvrir la lame de fuschine</p> <p>- Rincer à l'eau distillée</p>	<p>1 minute</p>	<p>La fuschine recoloré en rose les bactéries précédemment décolorées :</p> <p>les bactéries Gram – ou négatif.</p>
<p>SECHAGE</p>	<p>- Egoutter entre 2 morceaux de papierfiltre et laisser sécher</p>		

ANNEXE 02

Le matériel de prélèvement

- Des flacons stérilisés au préalable pour les prélèvements des échantillons d'eau.
- D'un sac isotherme pour le transport des échantillons de laitue et de sol.
- D'un marqueur pour l'étiquetage.
- Des gants

ANNEXE 03

Matériel de laboratoire

- Matériel de stérilisation : Four Pasteur, bec Bunsen, autoclave.
- Matériel de pesée : Balance de précision.
- Matériel d'incubation : étuves à 37°C et 42°C et bain marie agitateur à 42°C.
- Matériel divers : anse de platine, pipettes, micro-pipettes, béchers, porte-tubes, boîtes de Pétri,
- Pipettes Pasteur, flacons, vortex, réfrigérateur ; pince, microscope optique, lames, tube falquons,
- Tube a essaies, tube à hymolyse , papier filtre

ANNEXE 04

Réactifs :

- Réactif de Kovacs,
- Réactif VP I Alpha naphthol à 6%,
- Réactif VP II KOH à 40%
- Réactif Méthyl red (MR)
- Nitrate réductase I acide sulfanilique (en solution à 80 /100 en acide acétique 5N),
- Nitrate réductase II Naphtylamine (en solution à 60 /100 en acide acétique 5N),
- Réactif TDA (Tryptophane désaminase) solution de per chlorure de fer,
- Disques d'oxydase
- Huile de paraffine et de vaseline
- Violet de Gentiane (ou Violet Cristal sous forme sèche)
- Lugol
- L'alcool (éthanol à 95°) très peu dilué
- La Fuschine fraîchement préparée
- L'eau déminéralisée

ANNEXE 05

Composition des milieux de culture

Milieux	Composition (par litre)	
Bouillon Eau Peptonée Tamponnée	Peptone Chlorure de sodium Hydrogénoortho phosphate disodique Dihydrogéno-orthophosphate de potassium pH= 7,0 ± 0,	10,0 g 5,0 g 9,0 g 1,5 g
Bouillon Rappaport Vassiliadis	Peptone papainique de soja Chlorure de sodium Phosphate monopotassique Phosphate dipotassique Chlorure de magnésium anhydre Vert malachite (oxalate) pH = 5,2 ± 0,2	4,50 g 7,20 g 1,26 g 8 g 13,40 g 36,0 mg
Gélose MacConkey	Peptone pancréatique de gélatine Tryptone Peptone pepsique de viande Lactose Sels biliaires Chlorure de sodium Rouge neutre Cristal violet Agar agar bactériologique pH = 7,1 ± 0,2.	17,0 g 1,5 g 1,5 g 10,0 g 1,5 g 5,0 g 30,0 mg 1,0 mg 13,5 g
Gélose XLD	Extrait autolytique de levure L- Lysine. Lactose Saccharose Xylose . Désoxycholate de sodium Chlorure de sodium Thiosulfate de sodium Citrate ferrique ammoniacal Rouge de phénol Agar agar bactériologique pH = 7,4 ± 0,2	3,0 g 5,0 g 7,5 g 7,5 g 3,5 g 2,5 g 5,0 g 6,8 g 0,8 g 80,0 mg 13,5 g

Gélose Mannitol	Peptone Extrait de viande Chlore de sodium D-mannitol Rouge de phénol Agar PH=7,4±0,2 à 25°c	10g 1,0g 75,0g 10,0g 0,025g 15g
Bouillon Lactosé	Pepton Extrait de bœuf Lactose	10g 2g 1g
TSI(Triple suger Iron)	Extrait de viande de bœuf Extrait de levure Peptone trypsine Chlorure de sodium Citrate ferrique Lactose Glucose Saccharose Thiosulfate de sodium, 5H2O Rouge de phénol Agar PH= 7,4	3g 3g 5g 0,5g 0,5g 10g 1g 10g 0,5g 0, 024g 12g
Citrate de Simmons	Phosphate Chlorure de sodium Citrate de sodium Sulfate de magnésium BBT Agar PH =6,9 ± 0,2 à 25° C	

Résumé

Afin de garantir la sécurité du consommateur mais aussi pour faire face aux conséquences ravageuses sur la sante publique, la maîtrise de la contamination des produits par *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* et *EHEC* est une obligation

Notre travail dans sa partie pratique s'est captivé à deux endroits pertinents. Notamment, au marché et la ferme pour pouvoir réaliser des prélèvements de laitue, sol ainsi d'eau d'irrigation et le sol. Soixante-trois prélèvements ont été collectés à travers trois points de vente et quatre fermes. Et ce, sur territoire de la wilaya de Bejaia.

La recherche des bactéries a été réalisée toute en respectant la méthode adéquate et conformément aux normes NF EN ISO 11290- 1, norme ISO 6579:2002 et ISO 16654:2001

Les résultats obtenus ont montré une faible présence de deux souches caractérisées *Listeria*, ainsi que l'absence de salmonelle et d'EHEC, selon la littérature, soulignant que nous ne sommes pas à l'abri d'une épidémie potentielle.

Mots clés : NF EN ISO 11290- 1, ISO 6579 : 2002, ISO 16654 :2001,*Listeria* , *Salmonella* ,*EHEC*

Abstract

In order to guarantee consumer safety, but also to deal with the devastating consequences for public health, it is essential to control product contamination by *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *EHEC*.

The practical part of our work focused on two relevant locations. In particular, we went to the market and the farm to take samples of lettuce, soil and irrigation water. Sixty-three samples were collected from three sales outlets and four farms. All in the wilaya of Bejaia.

The bacteria were tested using the appropriate method, in accordance with standards NF EN ISO 11290-1, ISO 6579:2002 and ISO 16654:2001.

The results showed a weak presence of two characterised *Listeria* strains, as well as the absence of *Salmonella* and *EHEC*, according to the literature, underlining that we are not immune to a potential epidemic.

Key words: NF EN ISO 11290- 1, ISO 6579 : 2002, ISO 16654 :2001,*Listeria* , *Salmonella* ,*EHEC*