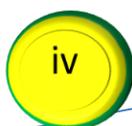


TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIERES	iv
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES.....	vii
GLOSSAIRE.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES TABLEAUX.....	x
INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I- GENERALITES SUR LES SALADES COMPOSEES	3
I-1 : DEFINITION D'UNE SALADE COMPOSEE	3
I-2 : LES SALADES COMPOSEES EN TANT QU'ALIMENTS DE RUE	4
I-2-1 : Localisation de la vente des salades composées	4
I-2-2 : Les consommateurs des salades composées	4
I-2-3 : Vendeurs des salades composées	4
I-3 : TYPES D'ALIMENTS DE RUE	5
II- GENERALITES SUR L'ESPECE <i>Bacillus cereus</i>	5
II-1 : HISTORIQUE	5
II-2 : DESCRIPTION TAXONOMIQUE DE <i>Bacillus cereus</i>	6
II-3 : DESCRIPTION PHYSIOLOGIQUE.....	7
II-3-1 : La cellule végétative	7
II-3-2 : Les spores.....	7
II-4 : ECOLOGIE DE L'ESPECE <i>Bacillus cereus</i>	8
II-4-1 : Réservoirs primaires.....	8
II-4-2 : Présence de <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments	8
II-5 : LES TOXI-INFECTIIONS ALIMENTAIRES A <i>Bacillus cereus</i>	9
II-6 : POUVOIR PATHOGENE.....	9
II-7 : DOSE INFECTIEUSE.....	10
II-8 : MODE DE TRANSMISSION.....	10
III- LES ANTIBIOTIQUES.....	10
III-1 : GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES	10
III-1-1 : Définition	10
III-1-2 : Classification des antibiotiques.....	10
III-2 : L'ANTIBIORESISTANCE.....	12
III-2-1 : Définition	12
III-2-2 : Résistances aux antibiotiques	12
III-2-2-1 : Résistance naturelle.....	12
III-2-2-2 : Résistance acquise	12
III-2-3 : Résistance de <i>Bacillus cereus</i> aux antibiotiques	12



III-2-4 : Les bactéries multirésistantes (BMR)	13
III-2-5 : Mécanismes de résistance bactérienne.....	13
MATERIELS ET METHODES.....	16
I- ZONE D'ETUDE.....	16
II- MATERIELS D'ETUDE	19
II-1 : MATERIELS ET EQUIPEMENTS DE LABORATOIRE	19
II-2 : LES MILIEUX DE CULTURES UTILISES.....	20
III- METHODES	20
III- 1 : CONTROLE QUALITE DES SALADES COMPOSES VIS-A-VIS DE <i>Bacillus cereus</i>	20
III- 1-1 : Echantillonnage.....	20
III-1-1-a : Technique de prélèvement.....	20
III-1-1-b : Conditionnement et transport des échantillons	21
III-1-2 : Préparation de la suspension mère	21
III-1-3 : Dénombrement de <i>Bacillus cereus</i>	21
III-1-3-a : Principe	21
III-1-3-b : Mode opératoire	22
III-1-4 : Mode de calcul	22
III-1-5 : Mode d'interprétation des résultats.....	22
III-1-6 : Purification.....	23
III-1-7 : Conservation	24
III-2: IDENTIFICATION ET TEST DE CONFIRMATION DE <i>Bacillus cereus</i> ..	24
III-2-1 : ETUDE DES CARACTERES CULTURAUX ET MORPHOLOGIQUES.....	24
III -2-1-1: Observation macroscopique.....	25
III-2-1-1-a : Principe.....	25
III-2-1-1-b : Mode opératoire.....	25
III-2-1-2 : Observation microscopique	25
III-2-1-2-1 : Examen à l'état frais	25
III-2-1-2-1-a : Principe.....	25
III-2-1-2-1-b : Mode opératoire.....	25
III-2-1-2-2 : Examen après coloration Gram.....	25
III-2-1-2-2-a : Principe.....	26
III-2-1-2-2-b : Mode opératoire.....	26
III-2-2 : ETUDE DES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES.....	26
III-2-2-1 : Type respiratoire	26
III-2-2-1-a : Principe.....	26
III-2-2-1-b : Mode opératoire.....	26



III-2-2-2 : Recherche de la catalase.....	27
III-2-2-2-a : Principe.....	27
III-2-2-2-b : Mode opératoire.....	27
III-2-3 : ETUDE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES.....	27
III-3-3-1 : Etude sur le milieu Hajna-Kligler	27
III-3-3-1-a : Principe.....	28
III-3-3-1-b : Mode opératoire.....	28
III-3-3-2 : Etude sur milieu Lysine-Fer.....	29
III-3-3-2-a : Principe.....	29
III-3-3-2-b : Mode opératoire.....	29
III-3-3-3 : Etude sur le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate	30
III-3-3-3-a : Principe.....	30
III-3-3-3-b : Mode opératoire.....	30
III-3-3-4 : Etude sur le milieu CITRATE DE SIMMONS.....	30
III-3-3-4-a : Principe.....	30
III-3-3-4-b : Mode opératoire.....	30
III-3 : ANALYSE STATISTIQUE.....	30
III-3-1 : Traitements des données sur XLSTAT	30
III-3-2 : Test de corrélation de Pearson.....	32
III-4 : ETUDE DE LA MULTIRESISTANCE.....	33
III-4-1 : Principe	33
III-4-2 : Mode opératoire	33
III-4-2-1 : Réalisation pratique de l'antibiogramme.....	33
III-4-2-1-a : Préparation de l'inoculum.....	33
III-4-2-1-b : Technique d'ensemencement	33
III-4-2-2 : Dépôt de disque	33
III-4-2-3 : Lecture et mode d'interprétation des résultats.....	33
RESULTATS ET INTERPRETATIONS	36
I :CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS	36
II : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES	37
II- 1 : Résultats des caractères culturaux.....	37
II- 2 : Résultats des caractères morphologiques	40
II- 3 : Résultats des caractères physiologiques.....	41
II- 4 : Caractères biochimiques	42
III- RESULTAT D'ANALYSE STATISTIQUE.....	44
III- 1 : Résultat d'analyse de la variance	44
III- 2 : Résultat du test de corrélation	46
IV- RESULTATS DU TEST D'ANTIBIOGRAMME	47
DISCUSSIONS.....	50

LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

ANOVA	: Analyse Of Variance	ISO	: International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)
ASJA	: Athénée Saint Joseph Antsirabe	LDA	: Lysine désaminase
ATCC	: American Type Culture Collection	LDC	: Lysine décarboxylase
Aw	: Activity of water (activité de l'eau)	NF	: Norme Française
BMR	: Bactéries multirésistantes	NHe	: Non-Haemolytic Enterotoxin (Entérotoxine non-hémolytique)
C	: Chloramphénicol	NOR	: Norfloxacin
°C	: Degré Celsius	OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
CA-SFM	: Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie	PCA	: Plate Count Agar
CIP	: Ciprofloxacin	pH	: potentiel d'hydrogène
CQIASA	: Centre Québécois d'inspection des aliments et de santé animale	PLPs	: Protéines de Liaison aux Pénicillines
E	: Erythromycine	SM	: Suspension Mère
EPT	: Eau Péptonée Tamponnée	TET	: Tétracycline
FAO	: Food and Agriculture Organisation	TIA	: Toxi-Infection Alimentaire
GTM	: Gentamycine	TIAC	: Toxi-Infection Alimentaire Collective
H₂S	: Acide sulfhydrique	TPM	: Triméthoprime
HACCP	: Hazard Analysis Critical Control Point	UFC	: Unités formant colonies
HBL	: Hemolysin Binding Lytic (Hémolysine des liaisons lytiques)	UFC/g	: Unités formant colonies par gramme
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique ; Avignon		

GLOSSAIRE

Activité de l'eau : Valeur comprise entre 0 et 1 et traduisant la quantité d'eau disponible dans un aliment et utilisable pour le métabolisme des microorganismes. En dessous de 0,65 ; aucun développement microbien n'est possible.

Aéro-anaérobie : Microorganisme capable de se développer en présence ou en absence d'oxygène.

Aéro-anaérobie facultatif : Microorganisme capable de se développer plus rapidement en présence d'oxygène mais peut supporter des conditions transitoires d'anaérobiose

Aérobic : Microorganisme qui se développe en présence d'oxygène.

Anaérobic : Microorganisme qui se développe en absence d'oxygène.

Antibiorésistante : Qui manifeste une résistance à un ou plusieurs antibiotiques.

Entérotoxine : Substance toxique (*toxine*) produite par un organisme (en particulier certaines bactéries, telles que *Bacillus cereus*), susceptible de provoquer des troubles intestinaux lors de sa diffusion dans le système digestif

Inoculum : Volume contenant le germe à ensemercer pendant les analyses microbiologiques.

Intoxication : Conséquence de l'ingestion d'un aliment dégradé par les bactéries en catabolites toxiques.

Intoxinations : Troubles liées à l'ingestion de toxines produites dans l'aliment avant sa consommation.

Multirésistance : Résistance d'une souche bactérienne à au moins deux antibiotiques différents, appartenant à des familles différentes.

Plasmide : Molécule d'ADN circulaire extra chromosomique de petite taille qui se réplique d'une manière autonome. Il porte les gènes qui codent les résistances bactériennes.

Souche : Groupe d'individus en principe génétiquement homogènes (clones).

Spore : Forme de résistance particulière des bactéries face à des conditions de vie défavorables.

Syndrome : Ensemble de signes, de symptômes, de modifications morphologiques, fonctionnelles ou biochimiques de l'organisme d'apparence parfois disparate mais formant une entité reconnaissable qui sans présager obligatoirement de ces manifestations, permettent d'orienter le diagnostic.

Tellurique : Milieu relatif à la terre, provient du sol.

Thermostable : Désigne ce qui est stable à haute température (ne se dégrade pas).

TIA : Infection causée par l'ingestion massive de bactéries et de toxines dans l'aliment

TIAC : TIA avec apparition d'au moins deux cas groupés similaires d'un symptôme, en général gastro-intestinal, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Toxine : Substance toxique élaborée par un organisme vivant (bactérie, champignon vénéneux, insecte ou serpent venimeux), auquel elle confère son pouvoir pathogène.

Ubiquitaire : (Omniprésence) Capacité d'être présent en tout lieu ou en plusieurs lieux simultanément.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Les plats constituant les salades composées.....	3
Figure 2 : Les plats d'une salade composée	3
Figure 3 : Différentes formes de <i>Bacillus cereus</i>	7
Figure 4 : Processus de sporulation et structure des spores de <i>Bacillus cereus</i>	7
Figure 5 : <i>Penicillium notatum</i> , découvert par Alexander Fleming	11
Figure 6 : Principales cibles des antibiotiques.....	11
Figure 7 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries	13
Figure 8 : Mode d'action des β -lactamases	15
Figure 9 : Carte de la Zone d'étude.....	16
Figure 10 : Qualité microbiologique des échantillons de salades composées.....	37
Figure 11 : Répartition des souches de <i>Bacillus cereus</i> isolées dans les échantillons	44
Figure 12 : Antibiorésistance des souches de <i>Bacillus cereus</i> isolées dans les salades composées	48
Figure 13 : Répartition de la sensibilité des souches isolées.....	49

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Types d'aliments vendus et quelques exemples	5
Tableau 2 : Présence de <i>Bacillus cereus</i> dans certains aliments	9
Tableau 3 : Mécanisme de résistance aux antibiotiques	15
Tableau 4 : Listes des marchés dans la Commune Urbaine d'Antananarivo.....	17
Tableau 5 : Coordonnées géographiques de chaque marché étudié.	17
Tableau 6 : Nombre d'habitant par Région.....	18
Tableau 7 : Nombre d'habitants dans chaque District de la Région Analamanga....	19
Tableau 8 : Liste des matériels de laboratoires.....	19
Tableau 9 : Mode de calcul de la variance	31
Tableau 10 : Analyse de la variance	32
Tableau 11 : Normes utilisées pour l'expression des résultats du test d'antibiogramme	34
Tableau 12 : Diamètres critiques pour diverses classes d'antibiotiques	34
Tableau 13 : Résultats d'analyse microbiologiques des salades composées.....	36
Tableau 14 : Caractères culturaux des souches isolées	37
Tableau 15 : Caractères morphologiques des souches présumés de <i>Bacillus cereus</i>	40
Tableau 16 : Caractères physiologiques des 12 souches	41
Tableau 17 : Caractères biochimiques des souches isolées.....	42
Tableau 18 : Répartition des souches de <i>Bacillus cereus</i> observée sur les marchés.....	43
Tableau 19 : Modèle de tableau traité sur XLSTAT.....	45
Tableau 20 : Résultat d'analyse de la variance.....	45
Tableau 21 : Nombre d'UFC/g de <i>Bacillus cereus</i> contenu dans les échantillons en fonction de la densité de la population.	46
Tableau 22 : Résultat du test de corrélation de Pearson (test paramétrique)	47
Tableau 23 : Résultats du test d'Antibiogramme.....	47
Tableau 24 : Tableau récapitulatif.....	50



INTRODUCTION

Divers travaux menés sur les aliments de rue tant à Madagascar qu'ailleurs ont montré des cas de toxi-infections alimentaires et cela est due à des agents microbiens, ce qui constitue un risque majeur pour la santé publique **(OMS, 1996)**.

Les maladies d'origine alimentaire constituent un problème courant et croissant de santé publique, que ce soit dans les pays développés ou ceux en voie de développement. Le taux de mortalité dû aux toxi-infections alimentaires est aussi flagrant dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Des milliards de personnes souffrent chaque année de maladies liées à l'absorption d'une nourriture contaminée et insalubre **(OMS, 2001a)**. Les toxi-infections occasionnées par des microorganismes deviennent un problème de santé publique de plus en plus important **(OMS, 2001b)**. Dans les pays industrialisés, la proportion de personnes souffrant chaque année de maladie d'origine alimentaire pourrait atteindre 30% dont aux États-Unis d'Amérique, 76 millions de cas surviennent chaque année, entraînant 325 000 hospitalisations et 5 000 décès. Le nombre d'intoxication alimentaire a augmenté au cours des dernières années dans les pays industrialisés **(Käferstein, 1997)**. 1,8 millions environ d'enfants morts de la maladie diarrhéique en 1998 issue d'une contamination par un agent microbien dans les pays en voie de développement **(Käferstein, 1997)**.

Les bactéries appartenant aux genres *Bacillus* et *Clostridium* sont capables de former des spores qui sont une forme de résistance et de dormance. Selon l'Institut de Veille Sanitaire **(INVS, 2012)**, *Bacillus cereus* est la troisième cause de Toxi-infection Alimentaire Collectives. Les cellules végétatives de *Bacillus cereus* forment des spores lorsqu'elles se trouvent en conditions environnementales défavorables. Ces spores peuvent rester à l'état latent pendant de nombreuses années voire des milliers d'années, attendant ainsi le retour des conditions favorables. La raison de cet état latent est la forte déshydratation du cœur de la spore, prévenant ainsi toute réaction enzymatique. Des milieux riches en nutriments déclenchent la germination des spores de *Bacillus cereus* ; celles-ci redeviennent des cellules végétatives actives, capables de produire des toxines qui sont à l'origine du syndrome émétique ou diarrhéique. Dans le cas de la toxine émétique (céréulide), celle-ci est thermostable et est produite dans l'aliment.



Cette étude est axée sur le contrôle microbiologique des salades composées vendues sur les marchés dans la Commune Urbaine d'Antananarivo (CUA) et la recherche des souches de *Bacillus cereus* résistantes et/ou multirésistantes vis-à-vis des familles des antibiotiques de référence. La présente étude comporte trois parties : une première partie sera axée sur l'étude bibliographique ; la deuxième partie parlera des matériels et méthodes qui définiront l'approche méthodologique adoptée dans cette étude de résistance de *Bacillus cereus* ; la troisième partie exposera les différents résultats obtenus, suivis des interprétations et discussions.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I- GENERALITES SUR LES SALADES COMPOSEES

I-1 : DEFINITION D'UNE SALADE COMPOSEE

Une « salade composée » ou « composé » est un aliment issu d'un mélange de plusieurs aliments crus et cuits. Les ingrédients d'une « salade composée » varient selon les préparateurs mais en général, elle est constituée de pâtes alimentaires (macaroni ou spaghetti), de plusieurs sortes de légumes dont principalement des carottes et des pommes de terre, des produits carnés comme la viande hachée, et de la mayonnaise. Les légumes constituant une « salade composée » sont cuits dans le cas des « hors-d'œuvre » et crus dans le cas des achards. Notons aussi que selon les préparateurs, les « salades composées » peuvent comporter de la sardine en conserve et des produits de charcuterie (RANDRIANARIVELO, 2014).



Les achards



a)

b)

a) Pâtes
b) Hors d'œuvre

Figure 1 : Les plats constituant les salades composées



Figure 2 : Les plats d'une salade composée

I-2 : LES SALADES COMPOSEES EN TANT QU'ALIMENTS DE RUE

Les salades composées vendues sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo sont classés parmi les aliments de rue qui sont prêts à être consommés.

I-2-1 : Localisation de la vente des salades composées

En tant qu'aliments de rue, les marchands des salades composées se rencontrent un peu partout, surtout dans les endroits surpeuplés ou des chemins très fréquentés. Selon **RAZAFY(987)**, les places publiques et les agglomérations peuvent se distinguer :

- **Ainsi sont les places publiques :**

Les périphéries des marchés, le long des trottoirs, les ruelles, les lieux de transport public, les proximités des écoles et des bureaux, lors des manifestations publiques telles que les fêtes foraines, les manifestations sportives et artistiques.

- **Les agglomérations :**

Ce sont : les cités ; les quartiers populaires ; les quartiers surpeuplés.

I-2-2 : Les consommateurs des salades composées

Il y a plusieurs types de consommateurs mais il est possible de les classer en 2 : - **les consommateurs occasionnels** : ils ont recours aux services du marchand pour étancher une soif passagère ou pour rattraper un repas sauté ;

- **les consommateurs permanents** : ce sont des habitués des aliments de rue qu'ils consomment régulièrement (souvent pour les trois repas de la journée).

I-2-3 : Vendeurs des salades composées

Concernant les vendeurs des salades composées, deux types sont rencontrés sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo :

- **les marchands sédentaires des salades composées** : ce type de vendeurs se rencontre surtout au marché, au bord de la rue, à côté des établissements ou usines. Les produits sont souvent vendus dans des gargotes, des stands ou des kiosques.

- **les marchands ambulants des salades composées** qui transportent leurs produits dans des caissons, des cuvettes, et de vitrines mobile. Ce type de marchand se déplace fréquemment et se rencontre aussi dans les lieux où il y a beaucoup de monde tels que le marché, à côté des bureaux ou des écoles.

I-3 : TYPES D'ALIMENTS DE RUE

Le tableau 1 montre quelques exemples de types d'aliments de rue vendus sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo.

Tableau 1 : Types d'aliments vendus et quelques exemples

Types d'aliments	exemples
Aliments carnés	Les brochettes, les grillades (kitoza), les abats (tripes, foie, rein,...), la tête et les pieds de bœuf et porc...
Plats de légume	Les macédoines de légumes, les achards (carottes, choux, concombres...), la soupe aux légumes, le « composé » ...
Aliments à base de farine	Les galettes (mofo gasy, ramanonaka, menakely,...), les amuse-gueules (nem, sambos...),...
Produits laitiers	Les yaourts fait maison, les tranches de fromage,...
Autres aliments	Les arachides, les fruits en tranche, les boissons (sirop, glace, clarinette,...), les tisanes (mangidy), le manioc, le tarot, le « koba ravina » et le « koba », ...

Source : RAZAFY, 1987

II- GENERALITES SUR L'ESPECE Bacillus cereus**II-1 : HISTORIQUE**

Bacillus cereus est une bactérie pathogène à Gram positif, de métabolisme aéro-anaérobie facultatif et capable de produire des spores dans des conditions défavorables de croissance. C'est un microorganisme mobile, en forme de bâtonnet de grande taille (>1.0 µm), parfois en chaînette et en colonies à l'aspect cireux et opaque sur milieux gélosés. C'est également une bactérie ubiquitaire retrouvée, principalement sous forme de spores, dans un grand nombre d'environnements tels que le sol (**Stenfors Arnesen et al., 2008**), la surface des végétaux (**Kouamé et al., 2013**) ou encore l'air ambiant (**Lues et al., 2007**).

Bacillus cereus fut isolé pour la première fois en 1887 par **Frankland, G.C.** et **Frankland, P.F.** dans l'air d'une étable au Royaume-Uni. La souche alors isolée appelée ATCC14579 est considérée comme une des souches types du groupe

Bacillus cereus et est utilisée comme souche modèle par de nombreux laboratoires. Le caractère pathogène de cette bactérie fut décrit pour la première fois en 1937 après la mort de cochons d'Inde auxquels des suspensions de *Bacillus cereus* avaient été injectées (Clark, 1937).

II-2 : DESCRIPTION TAXONOMIQUE DE *Bacillus cereus*

Selon Cohn, 1872, le genre *Bacillus* appartient au :

Règne	: BACTERIA
Embranchement	: FIRMICUTES
Classe	: BACILLI
Ordre	: BACILLALES
Famille	: BACILLACEAE
Genre	: <i>Bacillus</i>

Bacillus cereus, aussi dénommé *Bacillus cereus sensu stricto*, fait partie du groupe de *Bacillus cereus sensu lato*. Ce groupe comprend 7 espèces génétiquement apparentées :

- Bacillus anthracis***, non hémolytique et responsable de la maladie du charbon (Mock & Fouet, 2001).
- Bacillus thuringiensis***, qui synthétise un cristal parasporal contenant des toxines létal pour les insectes (Schnepf, et al.,1998).
- Bacillus mycoïdes*** et ***Bacillus pseudomycoïdes*** capables de former des rhizoïdes sur milieux gélosés (Nakamura, 1998).
- Bacillus weihenstephanensis***, une espèce psychrotolérante pouvant se développer à des températures de réfrigération comprises entre 4 et 7°C (Lechner, et al., 1998)
- Bacillus cytotoxicus***, une nouvelle espèce récemment décrite (Guinebrière et al., 2012).
- ***Bacillus cereus sensu stricto*** aussi appelé ***Bacillus cereus***, hémolytique, reconnu comme agent causal de toxi-infections alimentaires (TIA) mais aussi responsable dans une moindre mesure d'infections opportunistes locales et systémiques (Bottone, 2010 ; Logan, 2012).

Désormais dans la suite de ce manuscrit, l'appellation *Bacillus cereus* se rapportera toujours à *Bacillus cereus sensu stricto*.

La figure 3 montre les différentes formes de *Bacillus cereus* sous microscope optique.

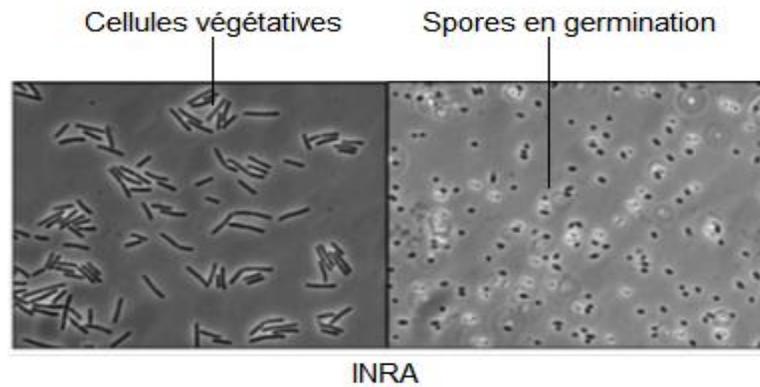


Figure 3 : Différentes formes de *Bacillus cereus* (ATCC 14579)

II-3 : DESCRIPTION PHYSIOLOGIQUE

II-3-1 : La cellule végétative

Bacillus cereus est un long bacille de forme régulière et souvent en courte chaîne. C'est un bacille à Gram + qui est mobile, aéro-anaérobie facultatif et qui forme des spores non déformantes. Les *Bacillus cereus* se développent sur géloses ordinaires. Les colonies ainsi obtenues sont grisâtres, larges avec des contours irréguliers.

En galerie Api 20 E, *Bacillus cereus* possède les caractères suivants : VP+, citrate+, gélatinase+. Sur gélose au sang de mouton elles possèdent une large hémolyse.

II-3-2 : Les spores

Afin de résister à un environnement qui n'est plus favorable à leur développement, certaines bactéries sont capables de sporuler. Ainsi, lors des conditions environnementales défavorables, *Bacillus cereus* produit des spores résistantes par rapport à la forme végétative. Le processus de sporulation et la structure des spores sont présentés dans la figure 4 :

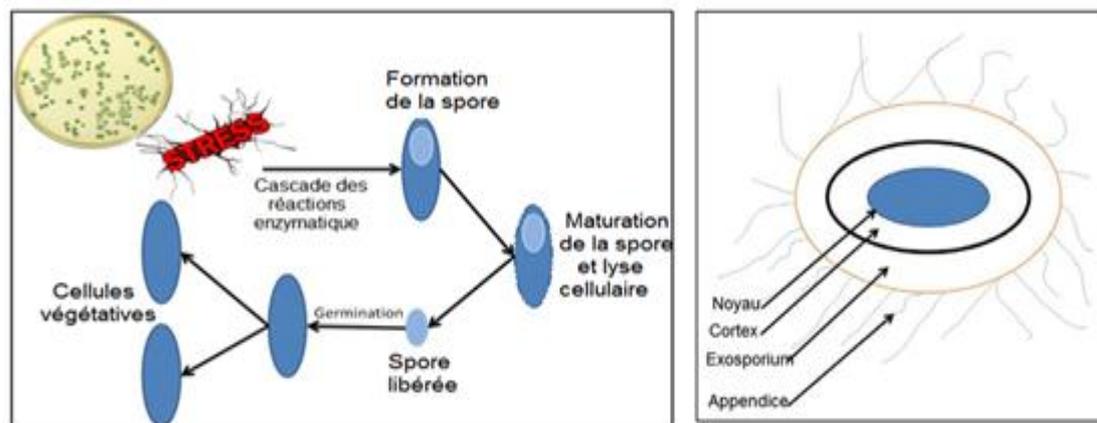


Figure 4 : Processus de sporulation et structure des spores de *Bacillus cereus*

Les spores de *Bacillus cereus* sont très résistantes et possèdent de remarquables capacités d'adhésion aux matières inertes. Leur adhésion sur de multiples surfaces est principalement due à 3 caractéristiques : leur grande hydrophobicité, la faible charge à la surface des spores et enfin leur morphologie avec la présence d'appendices (Andersson et al., 1995).

II-4 : ECOLOGIE DE L'ESPECE *Bacillus cereus*

II-4-1 : Réservoirs primaires

Le sol est considéré comme le réservoir primaire du groupe *Bacillus cereus* (Vilain et al., 2006). Un gramme de sol peut contenir de 10^3 à 10^5 spores de *Bacillus cereus* (Christiansson et al., 1999 ; Guinebretière et Nguyen-the, 2003). L'espèce *Bacillus cereus* est capable de se développer et d'avoir un cycle de vie dans le sol. Il est largement distribué dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Outre le sol, les intestins des insectes, des invertébrés et des rongeurs pourraient également constituer des niches naturelles du groupe *Bacillus cereus* (Margulis et al., 1998 ; Jensen et al., 2003 ; Swiecicka et al., 2006). Les espèces du groupe *Bacillus cereus* sont très répandues dans la nature et sont notamment retrouvées dans les fourrages pour animaux (Vaerewijck et al., 2001 ; Magnusson, 2007) et dans les fèces de bovins (Slaghuis et al., 1997).

II-4-2 : Présence de *Bacillus cereus* dans les aliments

Bacillus cereus peut être considéré comme un indicateur de contamination tellurique ou environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques. Les contaminations des aliments par *Bacillus cereus* sont associées à diverses sources en amont, en particulier l'environnement agricole et environnement industriel (Carlin, 2011). La présence de *Bacillus cereus* dans ces environnements entraîne ensuite la contamination des matières premières (Guinebretière et al., 2003).

Du fait de son caractère ubiquitaire et de sa capacité à sporuler, *Bacillus cereus* est présent dans un grand nombre d'environnements et en particulier les sols. En conséquence de nombreuses matières premières agricoles ou provenant du sol peuvent être potentiellement contaminées par cette bactérie sous sa forme végétative ou sa forme sporulée. Des études décrivent la présence de *Bacillus cereus* dans une large gamme d'aliments d'origine non animales et peu transformés allant des graines fermentées jusqu'aux morceaux de poulet. Ceci est montré dans le tableau 2.

Tableau 2 : Présence de *Bacillus cereus* dans certains aliments

Aliment	% d'échantillon contaminés par <i>Bacillus cereus</i>	Sources
Graines fermentées	39%	Agbobatinkpo <i>et al.</i> ,2013
Semoule de manioc	Jusqu'à 36%	Kouamé <i>et al.</i> ,2013
Riz	58%	Mortimer and McCann, 1974, Kim <i>et al.</i> ,2014
Poivre frais	100%	Valero <i>et al.</i> ,2002
Pomme de terre déshydraté	71%	Sagong <i>et al.</i> ,2013, Contezen <i>et al.</i> ,2014
Lait pasteurisé /UHT/en poudre	25%	Reis <i>et al.</i> ,2014
Poulet	45%	Smith <i>et al.</i> ,2004

II-5 : LES TOXI-INFECTIONS ALIMENTAIRES A *Bacillus cereus*

Il a été montré que *Bacillus cereus* fait partie des 4 plus importantes causes d'intoxication alimentaire commune (TIAC) en France (Albert *et al.*, 2009).

Selon l'Institut de Veille Sanitaire (INVS, 2012), *Bacillus cereus* a été la troisième cause de Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) en France, avec 1156 cas répartis sur 62 foyers entre 2006 et 2010. Ainsi, selon le ministère de la santé en France, une TIAC se définit comme l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

II-6 : POUVOIR PATHOGENE

Bacillus cereus peut provoquer 2 types d'intoxications alimentaires. Ceci est dû à sa capacité de produire des toxines qui sont à l'origine du syndrome émétique ou du syndrome diarrhéique.

Le syndrome émétique est causé par l'ingestion de la toxine émétique (appelée céréulide) préformée dans l'aliment. Cette toxine n'est pas inactivée au cours du traitement thermique des denrées alimentaires ni lors de son passage à travers le tube digestif en raison de sa grande résistance à la température, aux pH extrêmes et aux activités des protéases (Agata *et al.*, 2002; Rajkovic *et al.*, 2008; Shinagawa *et al.*, 1996). Ce syndrome est caractérisé par une courte période d'incubation (1 à 5 heures après ingestion des aliments) et se manifeste par des vomissements. Les aliments associés à ce syndrome sont principalement le lait pour les nourrissons, le riz et les pâtes (Ehling-Schulz *et al.*, 2004).

Le syndrome diarrhéique quant à lui, résulte des entérotoxines produites par les cellules végétatives de *Bacillus cereus*. Ces dernières se trouvent au niveau de la couche de mucus et attachées à l'épithélium dans l'intestin grêle (**Ceuppens et al., 2013**). Le temps d'incubation est donc plus long que pour le syndrome émétique et varie entre 12 h et 24 h. Il se manifeste par des crampes abdominales et une diarrhée. Les aliments incriminés pour ce syndrome sont généralement les produits à base de viande, les légumes et les produits déshydratés (**Stenfors Arnesen et al., 2008**).

II-7 : DOSE INFECTIEUSE

La toxine responsable de la forme diarrhéique de l'intoxication est produite par le bacille dans l'intestin grêle; la dose infectieuse est de 10^4 - 10^9 bacilles par gramme d'aliment. La toxine émétique est quant à elle préformée dans l'aliment ingéré (environ 10^5 à 10^8 bacilles par gramme d'aliment sont dans ce cas nécessaires à la production d'une quantité suffisante de toxine) (**Logan, Rodriguez-Diaz, 2006**).

II-8 : MODE DE TRANSMISSION

Le mode de transmission principal est l'ingestion d'aliments contaminés par *Bacillus cereus*. Le syndrome émétique est fortement associé à la consommation de riz et de pâtes alimentaires, tandis que le syndrome diarrhéique est principalement attribuable à la consommation de produits laitiers, de légumes et de viande (**Kotiranta, Lounatmaa et Haapasalo, 2000**).

III- LES ANTIBIOTIQUES

III-1 : GENERALITE SUR LES ANTIBIOTIQUES

III-1-1 : Définition

Selon **WAKSMAN**, les antibiotiques représentent « toutes les substances chimiques produites par des microorganismes capables d'inhiber le développement et de détruire les bactéries et d'autres microorganismes ».

III-1-2 : Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- **L'origine** : les antibiotiques d'origine naturelle sont les antibiotiques élaborés exclusivement par des microorganismes (exemple : la Pénicilline G élaborée par *Penicillium notatum* Figure 5) ; les molécules d'antibiotiques sont synthétisées à

partir de ces antibiotiques naturels (céphalosporines) ou sont entièrement synthétisés (Quinolones).

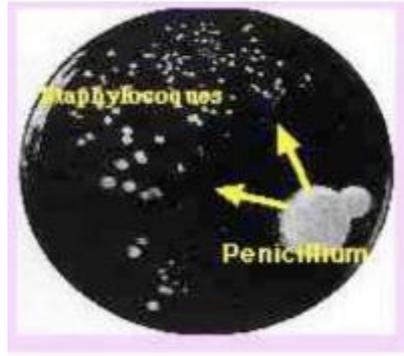


Figure 5 : *Penicillium notatum*, découvert par Alexander Fleming

(Source : Philippon A. Résistance des bactéries aux antibiotiques. Faculté de Médecine Paris Descartes. 2012.)

- **La nature chimique** : cette classification permet de grouper les antibiotiques en familles. En effet, les antibiotiques appartenant à une famille ont une structure de base commune, qui diffère d'une famille à une autre (β -lactamines, macrolides, aminosides...).

- **Le spectre d'activité** : les antibiotiques à spectre étroit sont efficaces sur une variété restreinte de bactéries, tandis que les molécules d'antibiotiques à spectre large sont actives sur plusieurs familles de bactéries différentes. Les antibiotiques peuvent aussi être bactéricides ou bactériostatiques.

- **Les modes d'action** : la cible bactérienne varie pour chaque groupe ou famille d'antibiotiques. Les principales cibles sont la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, la synthèse des acides nucléiques et la synthèse des protéines. (Philippon, 2012 ; Decoster et al.,2008). La figure 6 illustre les cibles des antibiotiques.

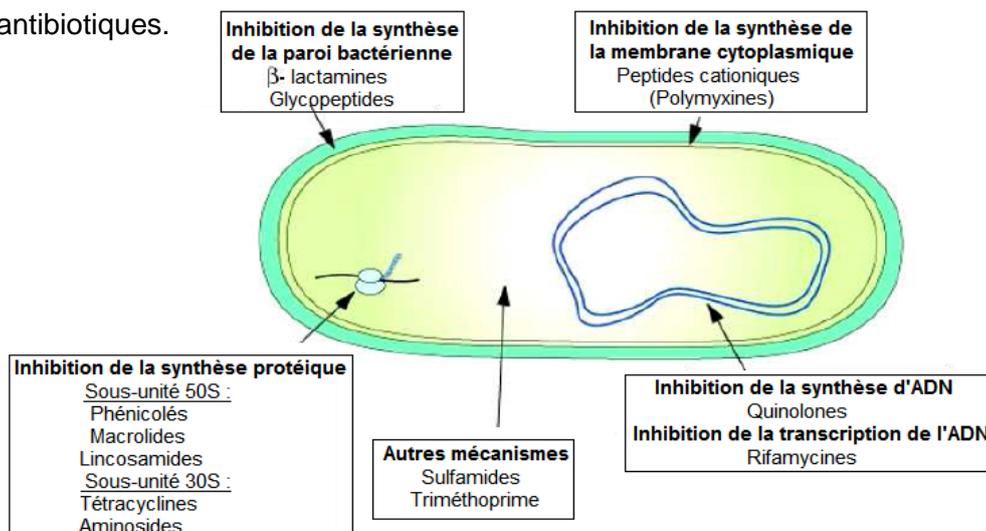


Figure 6 : Principales cibles des antibiotiques

Source : (<http://www.123bio.net/cours/antibio/modedaction.html>)

III-2 : L'ANTIBIORESISTANCE

III-2-1 : Définition

Généralement, « Une souche est dite résistante à un antibiotique lorsqu'une modification de son capital génétique lui permet de tolérer des concentrations d'antibiotique nettement plus élevées que celles qui inhibent la croissance *in vitro* de la majorité des autres souches de la même espèce dites sensibles » (**Guerin-Fauble, 2010**).

III-2-2 : Résistances aux antibiotiques

Selon Courvalin , 2008 ; Lozniewski et Rabaud, 2010. Il existe deux types de résistance aux antibiotiques. Ce sont la résistance naturelle et la résistance acquise.

III-2-2-1 : Résistance naturelle

Il s'agit d'une caractéristique spécifique à toutes les souches appartenant à une espèce ou à un genre bactérien. Elle est fixe et constante à l'intérieur du génome bactérien. De ce fait, leur transmission se fait systématiquement à la descendance, portée par le chromosome. La résistance naturelle ou intrinsèque permet de définir le spectre d'activité clinique d'un antibiotique et détermine un phénotype « sauvage » permettant une identification des bactéries. (**Andreu et Mainardi, 2003**). **Exemples** : la résistance des mycoplasmes aux β -lactamines par l'absence de la paroi ; *Klebsiella* résistants à l'Ampicilline/Ticarcilline.

III-2-2-2 : Résistance acquise

La résistance acquise ne s'applique qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne. Elle est parfois transmissible horizontalement entre les bactéries, même entre des espèces éloignées phylogénétiquement. La transmission verticale de la bactérie mère aux bactéries filles est possible (**Mainardi et al., 1996**). Cette résistance résulte d'une modification génétique par mutation ou acquisition de matériel génétique étranger. Ces mécanismes de résistance peuvent diffuser très rapidement dans une population.

III-2-3 : Résistance de *Bacillus cereus* aux antibiotiques

Les souches du groupe *Bacillus cereus* sont résistantes aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, y compris les céphalosporines de troisième génération (**Luna et al., 2007; Park et al., 2009; Chon et al., 2012**), mais sont aussi sensibles à la Chloramphénicol, à la Clindamycine, à la Vancomycine, à la Ciprofloxacine, à l'Érythromycine, à la Gentamycine, à la Tétracycline et à la Streptomycine (**Luna et al., 2007 ; Chaves et al., 2011 ; Chon et al., 2012**).

III-2-4 : Les bactéries multirésistantes (BMR)

La résistance aux antibiotiques est un phénomène général observé pour toutes les espèces bactériennes rencontrées chez l'Homme et lié à leur inéluctable évolution. On assiste de surcroît à des multi résistances.

Les BMR sont les souches bactériennes résistantes à au moins trois familles d'antibiotiques pour lesquelles les possibilités thérapeutiques sont réduites et parfois anéanties (Lugagne, 2008).

III-2-5 : Mécanismes de résistance bactérienne

La résistance des bactéries aux antibiotiques obéit à trois principaux mécanismes : la diminution de la quantité d'antibiotique actif, la modification de la cible des antibiotiques ou l'inactivation de l'antibiotique (Guerin-Fauble, 2010 ; Scott, 2009).

La figure 7 illustre les mécanismes de résistance bactérienne.

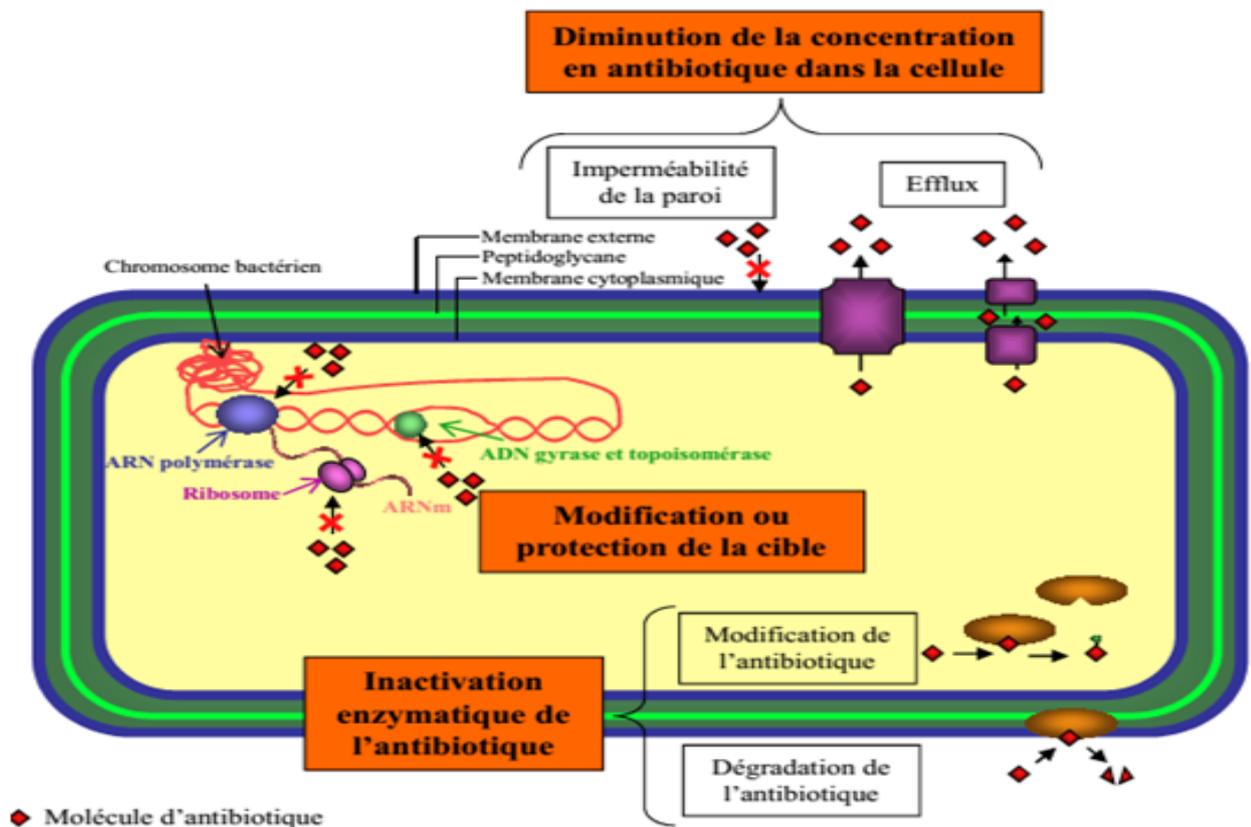


Figure 7 : Mécanismes de résistance aux antibiotiques des bactéries (Douard, 2011).

❖ Diminution de la quantité d'antibiotique atteignant la cible

- **Baisse de la perméabilité membranaire** : Suite à des mutations génétiques ou acquisition de gène étranger, la perméabilité de la paroi diminue ou disparaît, ne laissant ainsi qu'une quantité limitée d'antibiotiques entrer dans la

cellule bactérienne, insuffisante pour interagir avec sa cible. La principale voie d'entrée des antibiotiques, les porines de la membrane externe, s'obstruent partiellement ou totalement. Exemple : la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux carbapénèmes par la perte ou modification de la porine.

- **Les systèmes d'efflux** : Des systèmes d'efflux éjectant les molécules d'antibiotiques hors de la cellule bactérienne sont aussi mises en place par des bactéries. Ils sont constitués de protéines particulières utilisant une force proton-motrice expulsant l'antibiotique dès son entrée dans la cellule bactérienne. Ces systèmes sont rencontrés chez plusieurs espèces, telles les *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa* vis-à-vis des fluoroquinolones, tétracyclines, β -lactamine.

❖ **Modification de la cible**

La modification ou l'altération de la cible des antibiotiques est un autre type de résistance aux antibiotiques. Il s'agit d'une modification de la nature de la cible, en nombre ou par changement total de sa structure donnant naissance à des nouvelles cibles, contournant ainsi l'action des antibiotiques. Exemple : suite à des mutations, la modification du ribosome ou de l'ARN polymérase confèrent une résistance des mycobactéries à la streptomycine, à la rifampicine et aux macrolides.

❖ **Inactivation de l'antibiotique**

L'inactivation des antibiotiques est de loin le mécanisme le plus répandu par production enzymatique. Par exemple, les β -lactamases hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame des β -lactamines (exemple : pénicillines et céphalosporines) pour donner un acylenzyme qui sera ensuite dégradé en acide inactif (**Philippon et al., 1998**). L'hydrolyse irréversible du cycle β -lactame entraîne alors l'inactivation de l'antibiotique et la perte totale de son activité antibactérienne avant qu'il n'atteigne sa cible, les PLPs. L'analogie structurale que les β -lactamases partagent avec les PLPs leur permet d'inactiver les β -lactamines (**Massova et Mobashery, 1998**). Les β -lactamases sont exportées dans le milieu extracellulaire (bactéries à Gram positif) ou périplasmique (bactéries à Gram négatif). Ces enzymes peuvent aussi agir sur les antibiotiques en y insérant des groupements chimiques, rendant inactifs les molécules d'antibiotiques, tel est le cas des aminosides inactivés par phosphorylation, acétylation, ou adénylation.

La figure 8 illustre l'inactivation des β -lactamines sous l'action des β -lactamases.

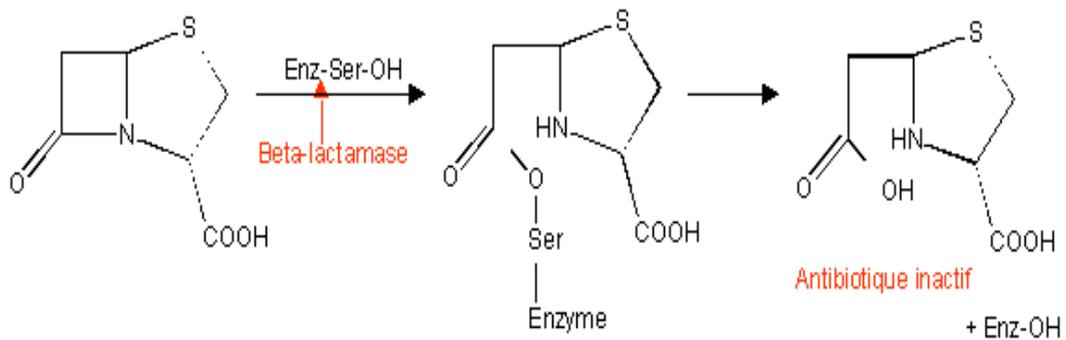


Figure 8 : Mode d'action des β -lactamases

(Ruppé, 2010)

Le tableau 3 montre le mécanisme de résistance bactérienne vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques.

Tableau 3 : Mécanisme de résistance aux antibiotiques

Catégories	Mécanismes	Familles d'antibiotiques concernées
Inaccessibilité à la cible « blindage »	Système actif d'efflux hors de la cellule	Tétracyclines, macrolides, phénicolés, quinolones, bêta-lactamines
	Diminution de la perméabilité	Phénicolés, tétracyclines
Inactivation	Inactivation enzymatique de l'antibiotique	Bêta-lactamases, estérases (macrolides), phosphorilases (aminosides, macrolides), acétyltransférases (chloramphénicol)
Esquive ou camouflage	Modification/ protection de la cible (par mutation ou voie enzymatique) Court-circuit de voie métabolique utilisée	Triméthoprim-sulfamides, tétracyclines, macrolides, bêta-lactamines, fluoroquinolones

Source : (Guillemot D. et al., 2006)

MATERIELS ET METHODES

I- ZONE D'ETUDE

L'étude a été faite dans les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo, Région Analamanga et District d'Antananarivo Renivohitra. Cette zone d'étude est donnée par la figure 9 suivante.

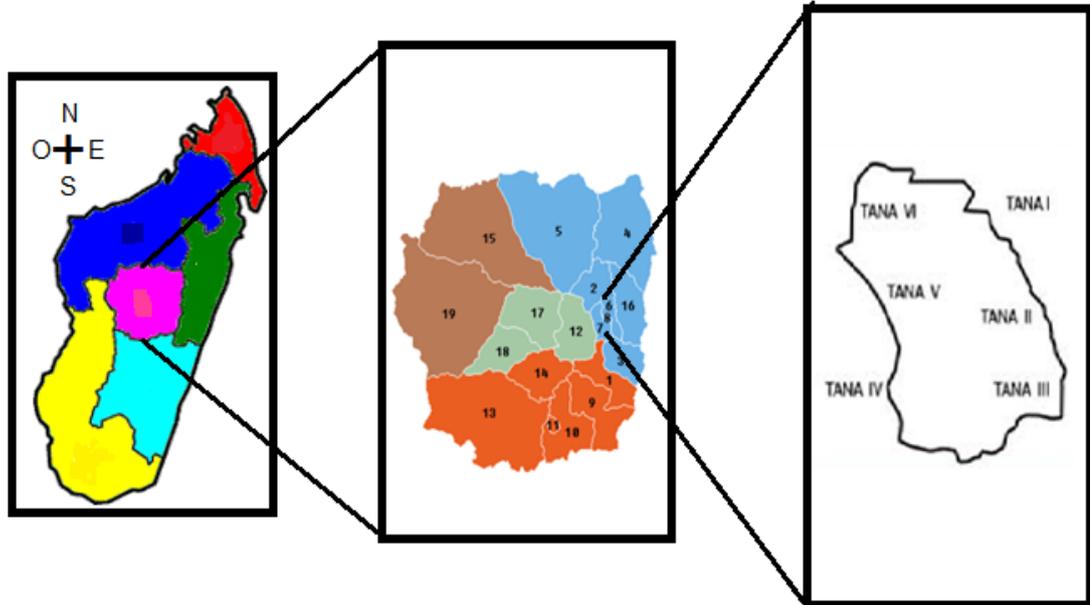


Figure 9 : Carte de la Zone d'étude

Source : Wikipédia et www.madagate.com

Le district d'Antananarivo Renivohitra est formé par six arrondissements et l'ensemble de ces six arrondissements forme la Commune Urbaine d'Antananarivo.

TANA I	: 1 ^{ère} arrondissement
TANA II	: 2 ^e arrondissement
TANA III	: 3 ^e arrondissement
TANA IV	: 4 ^e arrondissement
TANA V	: 5 ^e arrondissement
TANA VI	: 6 ^e arrondissement

Chaque marché observé sur les six arrondissements possède un jour ouvrable de leur vente. Ainsi, le tableau 4 suivant montre la date du marché, le nom du marché et le nom de l'arrondissement correspondant à chaque marché dans la Commune Urbaine d'Antananarivo.

Tableau 4 : Listes des marchés dans la Commune Urbaine d'Antananarivo

DATE	NOM DU MARCHÉ	ARRONDISSEMENT
Lundi	1. Ambohimanarina	Tana VI
Mardi	2. Besarety	Tana III
Mercredi	3. Andravoahangy	Tana III
Jeudi	4. Mahamasina	Tana IV
Vendredi	5. Pochard	Tana I
	6. Pavillons Analakely	
	7. Coum 67Ha	
	8. Petite vitesse	
Samedi	9. Isotry	Tana I
	10. Ambodin'Isotry	
Dimanche	11. Mahazo	Tana V
Tous les jours	12. Ambanidia	Tana II
	13. Anjohy	
	14. Ambondrona,	Tana III
	15. Anosibe	Tana IV
	16. Anosikely Soamanatombo	Tana IV

Source : <http://mairie-antananarivo.mg/les-marches-a-tana/>

Lors de cette étude, six marchés parmi les 16 représentés dans le tableau 4 ont été pris comme lieux d'échantillonnages. Le choix des marchés est basé sur leur localisation près de la capitale, sur le nombre de la population qui y vit et qui y fréquente.

Le tableau 5 montre les coordonnées géologiques de chaque marché où l'étude a été faite.

Tableau 5 : Coordonnées géographiques de chaque marché étudié.

Nom du marché	Coordonnée géologique
Andravoahangy	Latitude : S 19° 40' 59,999 '' Longitude : E 46° 23' 59,999 ''
Analakely	Latitude : S 18° 54' 23,566 '' Longitude : E 47° 31' 36,942 ''
Isotry	Latitude : S 18° 54' 42,416 '' Longitude : E 47° 30' 57,175 ''
67 Ha	Latitude : S 18° 54' 27,966 '' Longitude : E 47° 30' 28,284 ''
Anosibe	Latitude : S 18° 55' 42,955 '' Longitude : E 47° 30' 43,921 ''
Mahamasina	Latitude : S 18° 55' 10,649 '' Longitude : E 47° 31' 33,758 ''

Source : Coordonnées GPS et Google Map

Le tableau 6 montre le nombre d'habitants dans les 22 régions du Madagascar. Les échantillonnages ont été faits dans la région d'Analamanga qui est la région la plus peuplée de l'île.

Tableau 6 : Nombre d'habitants par Région

Ordre chronologique en fonction du nombre d'habitants	REGIONS	NOMBRE D'HABITANTS	SUPERFICIE en Km ²
1	Analamanga	3 439 589	16 911
2	Vakinankaratra	1 852 199	16 599
3	Vatovavy Fitovinany	1 454 863	19 605
4	Atsimo-Andrefana	1 352 456	66 236
5	Atsinanana	1 305 132	21 934
6	Sofia	1 280 847	50 100
7	Haute Matsiatra	1 231 696	21 080
8	Analanjorofo	1 063 197	21 930
9	Alaotra Mangoro	1 054 958	31 948
10	Sava	1 007 399	25 518
11	Atsimo-Atsinanana	923 068	18 863
12	Boeny	821 356	31 046
13	Androy	753 832	19 317
14	Itasy	752 703	6 993
15	Amoron'i Mania	734 413	16 141
16	Diana	719 000	19 266
17	Anôsy	690 019	25 731
18	Menabe	608 166	46 121
19	Bongolava	469 769	16 688
20	Ihorombe	320 775	26 391
21	Betsiboka	301 480	30 025
22	Melaky	297 446	38 852

Source : PopulationData.net ; MADAGASCAR, Liste des divisions administratives

En outre, puisque la superficie de la région d'Analamanga est de 16 911 Km², et pour que le choix des lieux d'échantillonnage soit valable, les salades composées ont été prélevés dans le district le plus peuplés de la région d'Analamanga qui est le district d'Antananarivo Renivohitra, où il y a une circulation abondante de TIAC selon l'ACSQDA.

Le tableau 7 montre le nombre de population de chaque district de la Région Analamanga ainsi que le nombre de population dans les 6 arrondissements du district d'Antananarivo Renivohitra.

Tableau 7 : Nombre d'habitants dans chaque District de la Région Analamanga.

LES 8 DISTRICTS DE LA REGION ANALAMANGA	NOMBRE D'HABITANTS (Chiffre en 2017)	Les 6 arrondissements de la District d'Antananarivo Renivohitra	NOMBRE D'HABITANTS (Chiffre en 2015)
ANTANANARIVO RENIVOHITRA	1 444 640	1 ^{ère} Arrondissement	236 521
ANTANANARIVO ATSIMONDRANO	650 753	2 ^{ème} Arrondissement	163 423
AMBOHIDRATRIMO	443 748	3 ^{ème} Arrondissement	135 416
ANTANANARIVO AVARADRANO	403 161	4 ^{ème} Arrondissement	212 411
MANJAKANDRIANA	227 028	5 ^{ème} Arrondissement	303 437
ANJOZOROBE	196 981	6 ^{ème} Arrondissement	117 690
ANDRAMASINA	189 186		
ANKAZOBE	168 524		
TOTAL ANALAMANGA	3 724 021		

Source : Projections démographiques – INSTAT ; POPULATION DE MADAGASCAR PAR DISTRICT - ANNEES 2015 à 2030

II- MATERIELS D'ETUDE

II-1 : MATERIELS ET EQUIPEMENTS DE LABORATOIRE

Des multitudes de matériels sont avérés nécessaires lors des études expérimentales dans les laboratoires de microbiologie de l'ASJA. Les matériels peuvent être classés en trois catégories : les verreries, les petits matériels et les gros matériels. Le tableau 8 suivant montre la liste de ces matériels.

Tableau 8 : Liste des matériels de laboratoires.

Les verreries	Les petits matériels	Les Gros matériels
Les boîtes de Pétri	Le bec Bunsen	
Les tubes à essai	Une anse d'inoculation	Hotte à flux laminaire
Les ballons	Une spatule	Autoclave
Les béchers	Le vortex	Etuve
Les éprouvettes graduées	La balance de précision	Incubateur
Les pipettes graduées	Une plaque chauffante	
Les pipettes Pasteur	Un gant	

Les photos de ces matériels sont données en annexe 1.

La composition des réactifs utilisée est en annexe 2.

II-2 : LES MILIEUX DE CULTURES UTILISES

Comme tout être vivant, pour se développer, les microorganismes ont besoin d'un apport nutritionnel. Les sources de carbone et d'azote, divers éléments minéraux, des facteurs de croissance, des substances inhibitrices et de l'eau vont être apportés par les milieux de culture. Les milieux de cultures utilisées sont subdivisés en deux groupes :

- **Les milieux sélectifs** : ce sont des milieux spécifiques pour le développement d'un seul type de microorganisme. Pour le dénombrement de *Bacillus cereus*, il est recommandé d'utiliser la Gélose de MOSSEL.
- **Les milieux électifs** : ce sont des milieux permettant le développement de plusieurs types de microorganismes. On distingue : le Plate Count Agar (PCA) et Gélose de Muller Hinton.

La composition chimique respective de ces milieux de culture ainsi que leur préparation sont représentées dans l'annexe 3.

III- METHODES

III- 1 : CONTROLE QUALITE DES SALADES COMPOSEES VIS-A-VIS DE *Bacillus cereus*

III- 1-1 : Echantillonnage

Trente échantillons de salades composées ont été prélevés sur 06 marchés (Marché d'Andravoahangy, d'Analakely, d'Isotry, de 67 Ha, d'Anosibe et de Mahamasina). Ces marchés ont été choisis car ce sont les plus grands marchés et les plus fréquentés de la ville d'Antananarivo, la capitale de Madagascar.

III-1-1-a : Technique de prélèvement

Durant le prélèvement, beaucoup d'éléments doivent être pris en compte. Ceci se traduit par les contraintes telles que :

- **Contrainte statistique** : le prélèvement doit être représentatif de grands marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo.
- **Contrainte microbiologique** : le manipulateur ne doit pas modifier la microflore du produit ou apporter des microorganismes étrangers.

En tenant compte de ces 2 contraintes, le prélèvement des 30 échantillons des salades composées a été réalisé avec la plus grande précaution et que chaque prélèvement doit être effectué dans des conditions d'asepsie parfaite.

L'échantillonnage était effectué au mois de février 2017 de 8h à 10h. Une fiche de prélèvement doit accompagner toujours sur chaque échantillon et qui doit contenir des informations nécessaires à l'identification des produits prélevés. Le contenu de la fiche est donné ci-après :

FICHE DE PRELEVEMENT	
<u>Nom du marché</u>	
<u>Date et heures de prélèvement</u>	
<u>Remarque sur le produit</u> : - consistance - Aspect	
<u>Codification des échantillons</u> : EXYN E : Echantillon XY : code du marché N : indice pour l'ordre de prélèvement	
<u>Exemple de codification</u> : Marché Andravoahangy 1 ^{er} prélèvement : EAN1 2 ^e prélèvement : EAN2	

III-1-1-b : Conditionnement et transport des échantillons

Les échantillons prélevés étaient ensuite mis dans des sachets de prélèvement stériles, puis transportés à basse température dans une glacière jusqu'au laboratoire d'analyse microbiologique, afin d'éviter la prolifération des microorganismes présents lors du transport. Notons que ces analyses microbiologiques ont été réalisées au laboratoire de microbiologie de l'Université Athénée Saint Joseph Antsirabe.

III-1-2 : Préparation de la suspension mère (NFV 08 002)

La préparation de la suspension mère (SM) est réalisée suivant les directives de la norme **NFV 08 002** en vue d'un examen microbiologique. Les manipulations se font de manière aseptique sous hotte à flux laminaire. **25g** de l'échantillon de composé à analyser sont mis en suspension dans **225 ml** d'EPT (Eau Peptonée Tamponnée) dans un ballon pour avoir un rapport **1/10**. La solution ainsi obtenue est ensuite homogénéisée manuellement pendant 10 à 15 minutes.

III-1-3 : Dénombrement de *Bacillus cereus*

III-1-3-a : Principe

Selon la norme NFV-08 058, la gélose sélective de MOSSEL est utilisée pour les détections et dénombrements des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires. Ce milieu de base est additionné avec une

émulsion stérile de jaune d'œuf et de supplément sélectif de polymixine B pour inhiber l'apparition des flores secondaires. Le milieu MOSSEL est riche en rouge de phénol agissant comme accélérateur de croissance. *Bacillus cereus* forme des colonies de couleur rose plate entourées d'un halo de précipité blanche.

III-1-3-b : Mode opératoire

1ml de l'inoculum provenant de la suspension mère est ensemencé en surface du milieu MOSSEL dans une boîte de Pétri stérile. Le dénombrement est réalisé en 2 exemplaires. L'incubation s'effectue à 30°C pendant 24heures.

III-1-4 : Mode de calcul (norme : ISO 7218)

Le nombre total de colonies présentes dans l'unité d'échantillonnage est donné par la formule ci-dessous :

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \cdot d} \times \frac{1}{V} \times \frac{V_{SM}}{V_{PR}}$$

Avec :

- N** : nombre de microorganismes par gramme d'échantillon.
- Σc** : nombre total de colonies sur les boîtes retenues
- n₁** : nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible.
- n₂** : nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.
- d** : facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés : dilution la plus faible
- V** : volume de prise d'essai inoculé en ml
- V_{SM}** : volume de la suspension mère en ml.
- V_{PR}** : volume de produit (ml) ou masse de produit (g) ou surface de produit (cm²) ayant constitué la suspension mère

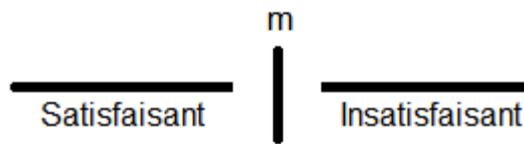
III-1-5 : Mode d'interprétation des résultats

L'interprétation des résultats du dénombrement se fait suivant un plan à deux ou à trois classes.

➤ **Plan à 2 classes**

Les résultats des examens interprétés sur cette base permettent de déterminer seulement deux classes de contamination :

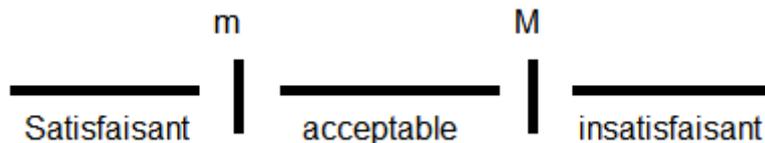
- Satisfaisant si le taux de bactéries est inférieur à la norme retenue ;
- Insatisfaisant si le taux de bactéries dépasse la norme retenue.



➤ **Plan à 3 classes**

Dans un plan d'échantillonnage à trois classes, les échantillons étudiés sont divisés en trois catégories: **satisfaisant, acceptable et insatisfaisant**. Un plan d'échantillonnage à trois classes est utilisé s'il est acceptable que certains échantillons dépassent la limite inférieure (m) dans la mesure où un niveau de contamination à risque (M) n'est pas dépassé.

- Les unités d'échantillonnage présentant un résultat de moins de « m » sont **satisfaisants** ou de bonne qualité bactériologique.
- Les unités révélant un résultat entre « m » et « M » sont jugées comme étant **acceptables** (médiocres),
- et les unités renfermant des comptes supérieurs à « M » sont **insatisfaisants** (non conformes).



Les valeurs de « m » et « M » pour *Bacillus cereus* contenue dans les aliments cuits prêts à consommer, sont:

- **$m = 1,0.10^3$ UFC/g**
- **$M = 1,0.10^4$ UFC/g**

Avec :

- m : critère fixé par l'arrêté ;
- M : seuil limite d'acceptation au-delà duquel le produit est considéré comme non satisfaisant.

III-1-6 : Purification

Les colonies dénombrées sur la gélose de MOSSEL ont été repiquées sur des boîtes de Pétri stérile contenant le même milieu suivant la méthode de quadrant et la méthode de quadrillage pour la purification des souches. La culture est mise à incuber à 30°C pendant 24 heures. L'observation de la pureté de la souche se fait de

façon macroscopique. La souche est dite pure lorsqu'un seul type de colonie est obtenue. Chaque souche est ensuite codée comme suit :

CODIFICATION DES SOUCHES BCXYN	
BC	: <i>Bacillus cereus</i>
XY	: code du marché
N	: indice pour l'ordre de prélèvement
Exemple de codification des souches : BCEAN3	
	BC : <i>Bacillus cereus</i>
	E : Echantillon
	AN : Andravoahangy
	3 : 3 ^{ème} prélèvement

III-1-7 : Conservation

Chaque souche pure est prélevée à l'aide d'une anse d'inoculation stérile puis ensemencée dans des tubes vissés contenant un milieu MOSSEL en pente. L'ensemencement de l'inoculum se fait à partir du fond du tube (à 1cm du fond) vers l'ouverture par des stries serrées et parallèles.

Au bout de 24h d'incubation à 30°C, les tubes contenant les souches pures sont conservés au réfrigérateur à +4°C.

La conservation consiste à garder les souches pures isolées à des conditions qui ralentissent leur métabolisme ou arrêtent même leur croissance. Ces souches maintenues pures serviront à l'identification et constitueront des souches de référence ou des souches d'étude pour d'autres examens.

III-2: IDENTIFICATION ET TEST DE CONFIRMATION DE Bacillus cereus

L'identification des microorganismes obtenus en souches pures est basée sur la détermination d'un certain nombre de caractères Elle repose sur l'étude des caractères culturels, morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches pures.

III-2-1 : ETUDE DES CARACTERES CULTURAUX ET MORPHOLOGIQUES

Cette étude comporte deux observations :

- observation macroscopique des colonies pour l'étude des caractères culturels

- observation microscopique des souches pures pour l'étude des caractères morphologiques

III -2-1-1: Observation macroscopique

Cette étude permet d'observer macroscopiquement l'aspect des colonies isolées sur un milieu solide en boîte de Pétri.

III-2-1-1-a : Principe

Après incubation à une température optimale de croissance et durant un temps bien défini, une souche microbienne forme une colonie qui lui est caractéristique et qui peut contribuer à son identification partielle à savoir : la couleur, l'aspect de la surface, la transparence, la consistance, la forme du relief, la taille et l'allure du contour.

III-2-1-1-b : Mode opératoire

La souche à identifier est repiquée et ensemencée sur de boîte de Pétri contenant le milieu MOSSEL de façon à obtenir des colonies isolées. L'aspect des colonies sont notés après l'inoculation à 30°C pendant 24 heures.

III-2-1-2 : Observation microscopique

Cette étude est basée sur une observation de la souche pure étudiée. Elle est réalisée sous microscope optique dans une zone d'identification. Un examen à l'état frais est effectué suivi d'une observation au microscope après la coloration GRAM.

III-2-1-2-1 : Examen à l'état frais

III-2-1-2-1-a : Principe

Cet examen consiste à déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de groupement et leur mobilité. Les manipulations se font en l'absence de toute fixation ou coloration des bactéries montées entre la lame et lamelle.

III-2-1-2-1-b : Mode opératoire

Une ansée de la souche à étudier est déposée sur une lame contenant une fine goutte d'eau physiologique ou de l'eau distillée. Ensuite, la suspension est recouverte par une lame couvre-objet. L'observation microscopique est immédiatement effectuée. Le résultat est obtenu à l'objectif x 100 en immersion.

III-2-1-2-2 : Examen après coloration Gram

Il s'agit d'une coloration complexe qui est obligatoire pour avoir une première étape d'identification des microorganismes comme les bactéries et les levures.

III-2-1-2-2-a : Principe

La coloration Gram est une coloration différentielle qui se base sur le comportement tinctorial des parois de la souche vis-à-vis du violet de gentiane. Elle nous renseigne sur la nature de la composition chimique de la paroi, des liaisons ioniques entre les groupements basiques du colorant et les groupements acides de la cellule et également la perméabilité de la paroi à l'alcool. Ainsi, les bactéries alcool-résistantes gardent leur coloration violette et sont dites à Gram positif, tandis que les autres perméables à l'alcool se recolorent en rose suite à l'application de la fuschine de Ziehl et sont qualifiées de bactéries à Gram négatif.

III-2-1-2-2-b : Mode opératoire

Une ansée de la souche pure est déposée puis étalée sur une lame bien stérile. La coloration Gram qui s'en suit nécessite 4 étapes :

- 1- Coloration avec la solution « violet de gentiane »
- 2- Mordançage avec la solution de lugol pour renforcer l'action de la gentiane
- 3- Décoloration par l'alcool
- 4- Recoloration à la fuschine de Ziehl. .

III-2-2 : ETUDE DES CARACTERES PHYSIOLOGIQUES**III-2-2-1 : Type respiratoire**

Le but de ce test est de déterminer le caractère aérobie, anaérobie ou aéro-anaérobie des souches pures.

III-2-2-1-a : Principe

Il s'agit de l'étude des comportements des souches vis-à-vis de l'oxygène de l'air. Le milieu doit être sans nitrate et contient du glucose. Le milieu Viande-Foie est conseillé pour cette étude.

III-2-2-1-b : Mode opératoire

Un ensemencement profond vertical, d'un inoculum de la souche étudiée, est effectué dans un tube stérile contenant déjà la quantité requise du milieu de culture encore en surfusion. Après 24 à 48 heures d'incubation à 30°C, cinq cas peuvent se présenter:

Après le temps nécessaire au développement bactérien, il est possible de reconnaître 4 types respiratoires différents:

- Aérobic stricte : Développement des souches à la surface du milieu
- Anaérobic stricte : développement unique en profondeur du tube ;
- Aéro-anaérobic facultatif et anaéro-aérobic facultatif : développement sur toute la hauteur du tube ;
- Micro-aérophile : développement en disque à l'interface aéro-anaérobic, c'est à dire croissance dans la zone intermédiaire du milieu

III-2-2-2 : Recherche de la catalase

III-2-2-2-a : Principe

Cette étude consiste à mettre en évidence la présence ou non de la catalase dans une souche microbienne. La présence de la catalase permet la décomposition de l'eau oxygénée en eau et en oxygène.

L'eau oxygénée est un produit toxique produit secrété par d'autres microorganismes pendant la respiration aérobie. Il y a formation de dégagement d'oxygène selon la réaction :



III-2-2-2-b : Mode opératoire

Une ou deux gouttes d'eau oxygénée 30% sont ajoutées à une suspension microbienne déposée préalablement sur une lame porte-objet. Une effervescence est notée en cas de réaction positive.

III-2-3 : ETUDE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES

L'étude des caractères biochimiques consiste à rechercher les modifications apportées au milieu de culture, suite à la diversité métabolique des souches bactériennes, afin de définir l'équipement enzymatique spécifique du germe. Cette étude est effectuée sur galeries Pasteur constituées par de nombreux milieux différents, comme le milieu Hajna-Kligler, le milieu Lysine Fer, le milieu Citrate-Simmons, et le milieu Mannitol- Mobilité-Nitrate.

III-3-3-1 : Etude sur le milieu Hajna-Kligler

Le milieu Hajna-Kligler est un milieu solide de couleur rouge conditionné en tubes avec une pente et un culot. Il est utilisé pour la recherche simultanée de l'utilisation du lactose, la fermentation du glucose, la production de sulfure d'hydrogène (H₂S) et du gaz.

III-3-3-1-a : Principe

Le milieu Hajna-Kligler est utilisé sous forme de gélose pente. Le virage de couleur ou non au niveau de la pente ou du culot permet de mettre en évidence 4 types de réactions :

- **L'utilisation du lactose** : pour utiliser le lactose, la souche bactérienne a besoin de deux enzymes, une β -galactoside perméase et β -galactosidase. La perméase favorise la pénétration du lactose dans la cellule et β -galactosidase (endoenzyme) coupe la molécule de lactose en glucose et en galactose. Ce métabolisme acidifie le milieu et traduit par un virage au jaune au niveau de la pente.
- **La fermentation du glucose** : ce métabolisme produit des acides et modifie le pH du milieu qui se manifeste par un virage au jaune au niveau du culot.
- **La production du gaz** : la fermentation du glucose s'accompagne de la production du gaz carbonique selon la voie d'Embden Meyerhof et le cycle de Krebs. Ce dégagement gazeux forme des bulles ou des poches gazeuses dans le milieu.
- **La production de sulfure d'hydrogène (H₂S)** : les composés soufrés tels que le thiosulfate sont réduits en sulfure d'hydrogène par le thiosulfate réductase, présent chez les microorganismes anaérobies. Cette réaction traduit par la présence d'une coloration noire dans une zone intermédiaire entre la pente et le culot.

III-3-3-1-b : Mode opératoire

Une ansée de la souche pure est ensemencée par piqûre centrale dans le culot suivi de stries parallèles et serrées au niveau de la pente. La lecture des résultats se fait de la manière suivante après 24 h d'incubation à 30 °C:

- Culot rouge : glucose-
- Culot jaune : glucose+
- Pente rouge : lactose-
- Pente jaune : lactose+
- Précipité noir : H₂S +

III-3-3-2 : Etude sur milieu Lysine-Fer

C'est un milieu solide, de couleur violette, contenant une faible quantité de glucose mais enrichie en Lysine et en Fer. Il permet la mise en évidence de la Lysine décarboxylase (LDC), et de la Lysine désaminase (LDA), pour des microorganismes fermentant le glucose. Il comprend 2 parties le culot et la pente.

III-3-3-2-a : Principe

Les microorganismes utilisent la lysine, comme source de carbone, ce qui entraîne un changement du pH, se traduisant pas le virage au jaune de l'indicateur, qui est le bromocresol. Le thiosulfate réductase catalyse la réduction des sels de fer composés soufrés, avec un dégagement de sulfure d'hydrogène (H₂S).

La fermentation du glucose, par les microorganismes acidifie le milieu de culture, fait baisser le pH et peut engendrer :

- Dans la pente (anaérobiose), la production de la LDC entraîne la formation de la cadavérine qui realcalinise le milieu.
- Sur la pente (aérobiose), la production de la LDA entraîne la formation des cétoacides ce dernier réagissent avec les sels de fer provoquant le virage au rouge vineux de la surface de la pente.
- La production de thiosulfate réductase entraîne la formation de H₂S traduit par la formation de sulfure noir.

III-3-3-2-b : Mode opératoire

Un prélèvement de la souche à étudier est effectué à l'aide de l'anse en platine et l'inoculum estensemencé par piqure centrale au niveau du culot et par des stries parallèles à la surface de la pente Puis les tubes sont incubés à 30°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats se fait comme suit :

- Le culot de couleur violette : Glucose probablement fermenté mais masqué par la LDC +
- Le culot de couleur jaune : glucose fermenté LDC -
- Pente de couleur rouge vineuse : LDA +
- Pente de couleur violette : LDA -
- Précipité noir : H₂S +

III-3-3-3 : Etude sur le milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate

Il s'agit d'un milieu semi-solide de couleur rouge

III-3-3-3-a : Principe

La fermentation du mannitol entraîne une acidification du milieu, se manifestant par le virage au jaune de l'indicateur de pH, qui est le rouge de phénol. Les microorganismes mobiles sont ceux qui se diffusent à partir de la ligne d'ensemencement, en créant un trouble dans le milieu de culture. Ceux qui sont immobiles croissent uniquement le long de la pique d'ensemencement. La réduction du nitrate par le nitrate réductase est mise en évidence, par la présence de nitrites formés, qui donnent une coloration rose en présence du réactif de GRIESS.

III-3-3-3-b : Mode opératoire

L'ensemencement de ce milieu se fait par piqûre centrale jusqu'au fond du tube au moyen de l'anse. Après 24h d'incubation à 30°C, le virage de la coloration et la turbidité du milieu sont notés.

III-3-3-4 : Etude sur le milieu CITRATE DE SIMMONS

Il s'agit d'un milieu synthétique, solide, en pente, de couleur verte, qui permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate par les microorganismes.

III-3-3-4-a : Principe

Seuls les microorganismes possédant le citrate perméase peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone. La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage au bleu de l'indicateur de pH qui est le bleu de bromothymol.

III-3-3-4-b : Mode opératoire

L'ensemencement se fait à l'aide d'une anse en une strie centrale du fond vers l'ouverture du tube. Le virage éventuel de l'indicateur de pH est observé après 24h -- 48h d'incubation à 30°C.

III-3 : ANALYSE STATISTIQUE

III-3-1 : Traitements des données sur XLSTAT

Après le test de confirmation, les données ont été analysées statistiquement par analyse de variance à un seul facteur : ANOVA (ANalysis Of Variance) sur logiciel XLSTAT version 6.0.3 dont le but est de déterminer le degré de contamination de *Bacillus cereus* au niveau de chaque marché.

Le test ANOVA est conçu pour comparer la variabilité à l'intérieur de chaque échantillon avec la variabilité entre les échantillons.

Les résultats sont considérés comme significativement différents lorsque Pr (Probabilité) < 0,05.

Pour calculer la Variance "F" d'une série statistique à un seul facteur, on utilise le test de Fisher pour lequel on forme un ratio. La variance est donnée par la formule suivante :

$$F = \frac{S^2E}{S^2I}$$

Avec S^2E : Variance entre les groupes

S^2I : Variance à l'intérieur des groupes

Ddl (degré de liberté) $t-1$ t =nombre d'échantillon ou groupe

$N-1$ N =nombre totale d'observation

Le tableau 9 suivant montre le mode de calcul de la variance.

Tableau 9 : Mode de calcul de la variance

Calcul de la variance entre les groupes	Calcul de la variance à l'intérieur des groupes
<p><u>Calcul de la somme des carrés entre les groupes :</u></p> $SC_E = \sum_{i=1}^t ni(\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$ <p>\bar{Y}_i = est la moyenne de i-ème groupe $\bar{Y}_{..}$ = moyenne générale de toutes les observations</p> <p>▲ Le nombre de d.d.l. associé à cette somme est égale a $t-1$, t étant le nombre d'échantillons ou de groupes.</p> <p>La variance entre les groupes est donc égale a :</p> $S^2E = \frac{SC_E}{t - 1}$	<p><u>Calcul de la somme des carrés entre les groupes :</u></p> $SC_I = \sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{ni} ni(\bar{Y}_{ij} - \bar{Y}_i)^2$ <p>\bar{Y}_{ij} = valeur représente la j-ème observation recevant le traitement i, \bar{Y}_i = moyenne générale de toutes les observations</p> <p>▲ Le nombre de d.d.l. associé à cette somme est égale a $N-t$, N étant le nombre total d'observations et t le nombre d'échantillons.</p> <p>La variance à l'intérieur des groupes est donc égale a :</p> $S^2I = \frac{SC_I}{N - t}$

La somme des carrés totale (SC_T) est la somme des carrés des déviations de chaque observation Y_{ij} par rapport à la moyenne générale $\bar{Y}..$. Elle est donnée par la formule suivante

$$SC_T = SC_E + SC_I$$

Le tableau 10 suivant montre la récapitulation d'analyse de la variance.

Tableau 10 : Analyse de la variance

Source de variation	Degrés de liberté	Somme des carres	Moyenne des carres	F
Entre les groupes	t-1	SC_E	S^2E	$F = \frac{S^2E}{S^2I}$
A l'intérieur des groupes	N-t	SC_I	S^2I	
Total	N-1	SC_T		

III-3-2 : Test de corrélation de Pearson

Après une analyse de variance à un seul facteur, on peut déterminer le test d'indépendance entre les variables aléatoires (Contamination des échantillons et densité de la population). Pour cela, on effectue un test de corrélation de Pearson (test paramétrique).

Le test d'indépendance entre deux variables x et y, à partir d'un échantillon de n couples de valeur est basée sur la valeur de pente en coordonnées réduites :

$$r = \frac{\sum(x - mx)(y - my)}{\sqrt{\sum(x - mx)^2 + \sum(y - my)^2}}$$

Où mx et my désignent les moyennes observées des x et des y.

III-4 : ETUDE DE LA MULTIRESISTANCE

Cette étude nécessite la réalisation de l'antibiogramme afin de prédire la sensibilité d'une souche bactérienne vis-à-vis d'un ou plusieurs antibiotiques.

III-4-1 : Principe

Le principe consiste à ensemencer une souche bactérienne en milieu Mueller Hinton en présence du ou des antibiotiques et à observer les conséquences sur le développement et la survie de celle-ci.

III-4-2 : Mode opératoire

III-4-2-1 : Réalisation pratique de l'antibiogramme

III-4-2-1-a : Préparation de l'inoculum

Les souches identifiées et conservées précédemment à +4°C sont repiquées sur gélose de Mueller Hinton puis incubées à l'étuve pendant 24 heures à 30°C pour avoir une culture jeune. Il s'agit d'une revivification des souches.

Après confirmation de la pureté des souches, une ansée d'une colonie isolée est mise en suspension dans 10ml de d'EPT pour avoir une opacité trouble de 0,5Mc Farland.

III-4-2-1-b : Technique d'ensemencement

Un ml de l'inoculum précédemment préparé est ensemencé à la surface du milieu de Mueller Hinton par la technique d'inondation à une concentration de 10^6 UFC/ml. Les boîtes de Pétri sont laissées sur la paillasse pendant 5 à 10 minutes, permettant aux cellules bactériennes de se fixer à la surface du milieu de culture. L'excès de la suspension est éliminé par aspiration à l'aide d'une micropipette.

III-4-2-2 : Dépôt de disque

A l'aide d'une pince stérile, les disques d'antibiotiques de références sont placés à la surface du milieu gélosé préalablement ensemencé. Les antibiotiques suivants ont été testés : Chloramphénicol, Ciprofloxacine, Norfloxacine, Tétracycline, Erythromycine, Triméthoprime- sulfaméthoxazole, Gentamicine.

III-4-2-3 : Lecture et mode d'interprétation des résultats

Il n'existe pas actuellement de recommandation spécifique du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie pour l'interprétation de l'Antibiogramme, ni diamètres critiques spécifiques pour *Bacillus cereus*

La mesure des diamètres d'inhibition est réalisée après une incubation à 30°C pendant 18 - 24 h de la boîte contenant les disques.

Les normes de CA-SFM 2012 (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de la Microbiologie) dans le tableau 8 ont été utilisées pour l'interprétation des résultats. Le critère de catégorisation des souches selon les valeurs critiques est donné par le tableau 11.

Tableau 11 : Normes utilisées pour l'expression des résultats du test d'antibiogramme

Catégorie	Diamètre (ϕ) (mm)
S	$\phi \geq D$
R	$\phi < d$
I	$d \leq \phi < D$

Source : CA-SFM 2012.

S : sensible

R : résistant

I : intermédiaire

Le tableau 12 montre la charge du disque et les diamètres critiques de chaque antibiotique utilisé.

Tableau 12 : Diamètres critiques pour diverses classes d'antibiotiques

Sigle	Famille	Nom de l'antibiotique	Charge du disque	Diamètres critiques (mm)	
				S	R
C	Phénycolés	Chloramphénicol	30 μ g	23 \geq	19<
CIP	Fluoroquinolones	Ciproflaxine	5 μ g	25 \geq	22<
NOR	Fluoroquinolones	Norfloxacine	10 μ g	25 \geq	22<
TET	Cyclines	Tétracycline	30 μ g	19 \geq	17<
E	Macrolides	Erythromycine	15 μ g	22 \geq	17<
TMT	Sulfanmides	Cotrimoxazole (Triméthoprimé/sulfaméthoxazole)	25 μ g (1,25+23,75)	16 \geq	10<
GM	Aminosides	Gentamicine	15 μ g	18 \geq	16<

Source : CA-SFM, 2012

Le tableau 12 sert de référence de mesure pour catégoriser les souches testées. Dans ce tableau 12, la charge du disque varie selon l'antibiotique. Ainsi, les disques que nous avons utilisés sont préparés à l'aide des papiers Buvard, environ 6mm de diamètre. Or, chaque disque ne peut retenir que 10 μ l de solution d'antibiotique. Alors, pour que la charge du disque soit valide, un rapport volume/volume entre la charge du disque et la capacité de chaque disque a été fait.

Par exemple, si nous voulons charger 30 μ g d'antibiotique dans un disque stérile de capacité 10 μ l, nous devons préparer 300mg d'antibiotique dans 1000ml. Soit 0,3g/l. cela veut dire qu'à l'aide d'une micropipette, 10 μ l de cette solution d'antibiotique 0,3 g/l est prélevé et imprégné dans le disque stérile pour avoir un disque imprégné d'antibiotique.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

I : CONTROLE QUALITE DES ECHANTILLONS

Les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les salades composées varient selon la localisation de chaque marché. Ils sont donnés dans le tableau 13. Le mode d'interprétation des résultats obtenus se fait selon un plan à 2 classes.

Tableau 13 : Résultats d'analyses microbiologiques des salades composées.

MARCHES	ECHANTILLONS	Nombre de <i>Bacillus cereus</i> présumées /g d'échantillon	Critère microbiologique de référence (CQIASA)	Interprétation
ANDRAVOAHANGY	EAN1	1,1 .10 ³	1,0.10 ³ UFC/g	Insatisfaisante
	EAN2	8,0.10 ²		Satisfaisante
	EAN3	9,0.10 ²		Satisfaisante
	EAN4	5,0.10 ²		Satisfaisante
	EAN5	1,1 .10 ³		Insatisfaisante
ANALAKELY	EAK1	2,0.10 ²		Satisfaisante
	EAK2	3,0.10 ²		Satisfaisante
	EAK3	3,0.10 ²		Satisfaisante
	EAK4	4,0.10 ²		Satisfaisante
	EAK5	1,2 .10 ³		Insatisfaisante
ISOTRY PETITE VITESSE	EIS1	1,8 .10 ³		Insatisfaisante
	EIS2	6,0.10 ²		Satisfaisante
	EIS3	5,0.10 ²		Satisfaisante
	EIS4	4,0.10 ²		Satisfaisante
	EIS5	1,1 .10 ³		Insatisfaisante
67 HA	EHA1	10 .10 ²		Satisfaisante
	EHA2	8,0.10 ²		Satisfaisante
	EHA3	1,9 .10 ³		Insatisfaisante
	EHA4	4,0.10 ²		Satisfaisante
	EHA5	9,0.10 ²		Satisfaisante
ANOSIBE	EAB1	6,0.10 ²		Satisfaisante
	EAB2	1,1 .10 ³		Insatisfaisante
	EAB3	4,0.10 ²		Satisfaisante
	EAB4	9,0.10 ²		Satisfaisante
	EAB5	2,0.10 ²		Satisfaisante
MAHAMASINA AMPEFILOHA	EMA1	1,2 .10 ³	Insatisfaisante	
	EMA2	3,0.10 ²	Satisfaisante	
	EMA3	1,0.10 ²	Satisfaisante	
	EMA4	9,0.10 ²	Satisfaisante	
	EMA5	2,0.10 ²	Satisfaisante	

Source : Auteur, 2017

Les résultats dans le tableau 13 montrent que le nombre d'UFC/g de *Bacillus cereus* est différent sur chaque échantillon. Il y a des échantillons qui ont un nombre de *Bacillus cereus* supérieur au critère microbiologique de référence (1.10^3 UFC /g) et ceux ayant un nombre inférieur à ce critère. Ces taux varient entre 0,1 UFC/g à $1,9.10^3$ UFC/g. 26,66% des échantillons sont de qualité insatisfaisante tandis que 73,33% sont de qualité satisfaisante. La figure 10 montre ces pourcentages.

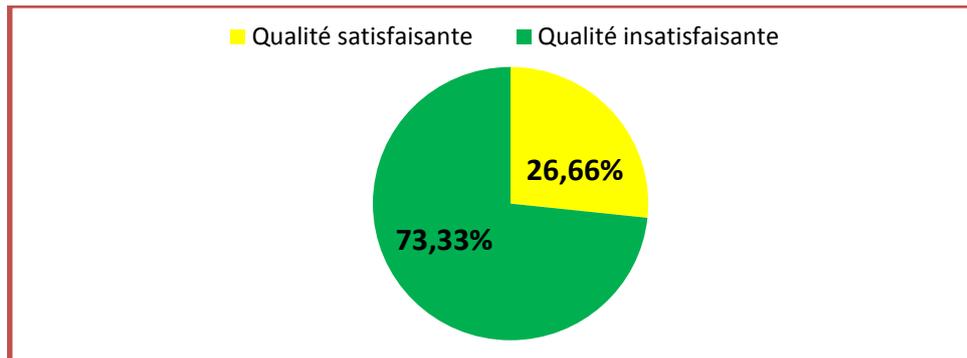


Figure 10 : Qualité microbiologique des échantillons de salades composées

Les colonies sur boîte de *Bacillus cereus* dénombrées sont données en annexe 4. Ainsi, 30 souches ont été isolées, purifiées. Les souches pures obtenues ont été identifiées pour avoir la confirmation de leurs appartenances à l'espèce *Bacillus cereus*.

II : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES

II- 1 : Résultats des caractères cultureux

Le tableau 14 montre les caractères cultureux des 30 souches isolées.

Tableau 14 : Caractères cultureux des souches isolées

Souches	Couleur des colonies	Taille des colonies	Forme du relief	Aspect de la colonie	Allure des contours	Transparence	Consistance	Aspect de la surface	Odeur
BCEAN1	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAN2	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAN3	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde

Souches	Couleur des colonies	Taille des colonies	Forme du relief	Aspect de la colonie	Allure des contours	Transparence	Consistance	Aspect de la surface	Odeur
BCEAN4	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEAN4	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEAN5	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEAK1	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEAK2	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEAK3	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAK4	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAK5	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEIS1	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEIS2	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEIS3	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEIS4	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEIS5	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEHA1	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEHA2	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Filante	Muqueuse	Nauséabonde
BCEHA3	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEHA4	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde

Souches	Couleur des colonies	Taille des colonies	Forme du relief	Aspect de la colonie	Allure des contours	Transparence	Consistance	Aspect de la surface	Odeur
BCEHA5	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEAB1	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAB2	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEAB3	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	Bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEAB4	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEAB5	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCECM1	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEMA2	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde
BCEMA3	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
BCEMA4	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Lisse	Nauséabonde
BCEMA5	Jaune et absence d'un halo opaque	Petite	bombé	lisse	Régulier	Opaque	Crémeuse	Muqueuse	Nauséabonde
Référence	Roses entourées d'un halo opaque	Grande	Plate	Cireux	Irrégulier	Opaque	Sèche	Rugueuse	Nauséabonde

Source : Auteur, 2017

Concernant les caractères cultureux, les résultats présentés dans le tableau 12 montrent que parmi les 30 souches isolées sur les 30 échantillons, 12 souches de *Bacillus cereus* ont été suspectées. Les 18 souches restantes peuvent être des souches phylogénétiquement apparentées à *Bacillus cereus*.

Sur la gélose MOSSEL, la colonie de *Bacillus cereus* est une colonie de couleur rose, de grande taille entourée d'un halo opaque et blanchâtre, contour irrégulier, un relief plate d'aspect cireux, une consistance sèche, opaque et a une odeur nauséabonde.

Les 12 souches présumées de *Bacillus cereus* ont été conservées pour la suite des manipulations dont le test de confirmation et l'étude de la multiresistance.

Il s'agit des souches BCEAN3, BCEAN5, BCEAK5, BCEIS2, BCIS4, BCEIS5, BCEHA1, BCEHA3, BCEHA4, BCAB2, BCAB4 et BCMA2.

BCAN3 et BCAN5 sont des souches dans les échantillons prélevées à Andravoahangy ; BCEIS2, BCIS4, BCEIS5 à Isotry ; , BCEHA1, BCEHA3, BCEHA4 à 67Ha ; BCAB2, BCAB4 à Anosibe et BCMA2 à Mahamasina.

Le schéma qui montre les caractères morphologiques des souches isolées est donné en annexe 5.

II- 2 : Résultats des caractères morphologiques

Sous microscope optique, les résultats des caractères morphologiques des 12 souches présumées de *Bacillus cereus* sont représentés par le tableau 15.

Tableau 15 : Caractères morphologiques des souches présumés de *Bacillus cereus*

Souches	A l'état frais				Coloration Gram	
	Forme	Taille	Mode de regroupement	Mobilité	Coloration	Gram
BCEAN3	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEAN5	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEAK5	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEIS2	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEIS4	Bâtonnet	Grande	Paire	Mobile	Violet	Positif
BCEIS5	Bâtonnet	Grande	Paire	Mobile	Violet	Positif
BCEHA1	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEHA3	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEHA4	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCEAB2	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
BCAB4	Bâtonnet	Grande	Chainette courte	Mobile	Violet	Positif
BCMA2	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif
Référence	Bâtonnet	Grande	Isolé	Mobile	Violet	Positif

Source : Auteur, 2017

L'observation microscopique des 12 souches montre qu'elles sont en forme de bâtonnet, isolés ou groupés par paire ou en chaînette courte et qui sont des bacilles de grande taille, à Gram positif. Celles-ci correspondent aux caractères morphologiques des *Bacillus cereus*.

II- 3 : Résultats des caractères physiologiques

Les caractères physiologiques des 12 souches suspectés sont donnés dans le tableau 16 :

Tableau 16 : Caractères physiologiques des 12 souches

Souches	Catalase	Type respiratoire
BCEAN3	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEAN5	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEAK5	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEIS2	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEIS4	Négative	Aéro-anaérobie facultatif
BCEIS5	Négative	Aéro-anaérobie facultatif
BCEHA1	Négative	Aéro-anaérobie facultatif
BCEHA3	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEHA4	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCEAB2	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCAB4	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
BCMA2	Positive	Aéro-anaérobie facultatif
Référence	±	Aéro-anaérobie facultatif

Source : Auteur, 2017

D'après le test respiratoire, toutes les souches sont aéro-anaérobie facultatives puisqu'elles se développent sur toute la longueur du milieu dont la partie supérieure est plus importante. Elles peuvent se développer en présence ou en absence d'O₂ libre dans le milieu mais préfèrent l'aérobie.

Le type respiratoire constitue un facteur important pour identifier les bactéries. En effet, pour identifier et classier un microorganisme, ce paramètre est fondamental. 09 souches parmi 12 possèdent de la catalase, enzyme qui empêche l'accumulation de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et 03 parmi 12 n'en possèdent pas.

II- 4 : Caractères biochimiques

Les principales caractéristiques de *Bacillus cereus* sont données en annexe 6. Le tableau montre les caractères biochimiques des souches isolées.

Tableau 17 : Caractères biochimiques des souches isolées.

Souches	Hajna Kligler				Lysine Fer		Mannitol Mobilité Nitrate			Citrate de Simmons
	Glucose	lactose	H ₂ S	Gaz	LDC	LDA	Mannitol	Mobilité	Nitrate	Citrate
BCEAN3	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BCEAN5	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BCEAK5	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BCEIS2	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BCEIS4	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
BCEIS5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
BCEHA1	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
BCEHA3	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
BCEHA4	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
BCEAB2	+	-	-	+	+	--	-	+	+	+
BCAB4	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
BCMA2	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Référence	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+

Source : Auteur, 2017

LDA : Lysine Désaminase ; LDC : Lysine Décarboxylase ;

+ : Réaction positive ; - : Réaction négative.

La lecture des résultats montre que 07 souches parmi 12 possèdent les mêmes caractères biochimiques que *Bacillus cereus*.

Ces souches :

- Fermentent le glucose, ce qui manifeste un virage au jaune au niveau du culot.
- Ne possèdent pas de β -galactosidase, c'est-à-dire qu'elles sont lactose négative car la couleur de la pente est rouge.
- Produisent du gaz.
- Ne produisent pas de sulfure d'hydrogène (H₂S).
- Produisent de la Lysine Décarboxylase et qui entraîne la formation de la cadaverine. Donc elles sont LDC+.
- Ne produisent pas de la Lysine Désaminase et qui cause l'absence de la formation de cétoacides responsable du virage de la pente en rouge vineux. Donc elles sont LDA-.
- Ne fermentent pas le mannitol, elles sont mobiles et possèdent le nitrate réductase.
- Possèdent de citrate perméase, alors elles peuvent utiliser le citrate comme seul source de carbone.

Les 05 souches restantes ne possèdent pas les mêmes caractères biochimiques que *Bacillus cereus*. Toutefois, elles fermentent le glucose, produisent des gaz, Par contre, 03 parmi ces 05 souches sont capables de produire de L'H₂S.

Ces différents tests de confirmation permettent de déduire la répartition exacte des *Bacillus cereus* ainsi que le nom des marchés correspondants, tableau 18.

Tableau 18 : Répartition des souches de *Bacillus cereus* observée sur les marchés.

Marchés	Echantillons	Code des souches
ANDRAVOAHANGY	EAN3	BCEAN3
	EAN5	BCEAN5
ANALAKELY	EAK5	BCEAK5
ISOTRY	EIS2	BCEIS2
67 HA	EHA3	BCEHA3
ANOSIBE	EAB2	BCEAB2
MAHAMASINA	EMA2	BCEMA2

Source : Auteur, 2017

Tous les caractères culturaux, morphologiques, physiologiques et biochimiques nous confirment que sur 12 souches, 58,33% sont des souches de *Bacillus cereus* et 41,66% sont des souches apparentées de *Bacillus cereus*. La figure 11 montre la répartition de ces souches.

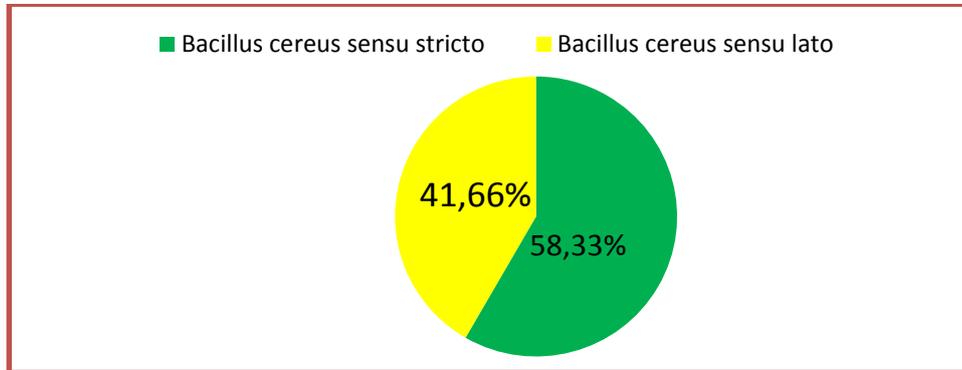


Figure 11 : Répartition des souches de *Bacillus cereus* isolées dans les échantillons

La lecture des résultats de *Bacillus cereus* sur les milieux d'identification est donnée en annexe 7.

III- RESULTAT D'ANALYSE STATISTIQUE

III- 1 : Résultat d'analyse de la variance

La démarche pour l'interprétation des résultats d'analyse de la variance comporte 5 étapes :

- Présentation des donnés,
- Mise en place des hypothèses,
- Test de comparaison des moyennes
- Test de Fisher
- Décision finale.

➤ **Présentation des donnés**

- Variable qualitative appelée facteur : Echantillons contaminées
- Variable dépendante, réponse notée Y : UFC/g de *Bacillus cereus*

Le tableau 19 montre le modèle du tableau traité sur XLSTAT.

Tableau 19 : Modèle de tableau traité sur XLSTAT

Echantillons contaminées	UFC/g de <i>Bacillus cereus</i>
EAN3	954 = (9.10 ²)
EAN5	1090 = (1,1.10 ³)
EAK5	1227 = (1,2.10 ³)
EIS2	636 = (6,0.10 ²)
EHA3	1890 = (1,8.10 ³)
EAB2	1072 = (1,1.10 ³)
EMA2	1245 = (1,2.10 ³)

Source : Auteur, 2017

➤ **Mise en place des hypothèses**

- **L'hypothèse nulle H₀** : les degrés de contamination par *Bacillus cereus* des échantillons sont égaux.
Soit $H_0 : \{EAN3 = EAN5 = EAK5 = EIS2 = EHA3 = EAB2 = EMA2\}$
- **L'hypothèse alternative H₁** : les degrés de contamination par *Bacillus cereus* des échantillons ne sont pas tous égaux.
Soit : $H_1 : \{EAN3 \sim EAN5 \sim EAK5 \sim EIS2 \sim EHA3 \sim EAB2 \sim EMA2\}$

➤ **Test de comparaison des moyennes**

- **L'hypothèse nulle H₀** est vraie si la variation au facteur SC_E est plus petite par rapport à la variation résiduelle SC_i. (SC_E < SC_i).
- **Par contre, l'hypothèse alternative H₁** est vraie si la variation au facteur SC_E est plus grande par rapport à la variation résiduelle SC_i. (SC_E > SC_i).

Le résultat du traitement des données est présenté dans le tableau 20.

Tableau 20 : Résultat d'analyse de la variance

Source	Ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Modèle	5	831924,357	166384,871	3,930	0,365
Résidus	1	42340,500	42340,500		
Total	6	874264,857			

Source : Auteur 2017

Ce tableau 20 montre que la variation au facteur $SC_E = 831924,357$ est plus grande que la variation résiduelle $SC_I = 42340,500$. Ce test de comparaison des moyennes indique que **l'hypothèse alternative H_1 est vraie**.

➤ **Test de Fisher**

Le test de Fisher noté F de Fisher permet de savoir $F_{t-1, N-1}$ obtenu par le rapport entre les carrées moyennes. Le résultat dans le tableau 20 montre que F de Fisher est 3,930.

➤ **Décision finale**

Pour un seuil donné α (5% en général), les tables de Fisher nous fournissent une valeur critique **c**. Les résultats possibles de la décision finale sont :

- Si F de Fisher < c, alors l'hypothèse H_0 est vraie,
- Si F de Fisher > c, donc l'hypothèse H_1 est vraie.

La valeur de **c** présenté dans le tableau 20 est de 0,365. Cela montre que la valeur de F de Fisher 3,930 est supérieure à c. Ce qui confirme que l'hypothèse nulle H_0 est rejetée et l'hypothèse alternative H_1 est acceptée, c'est-à-dire que les degrés de contamination par *Bacillus cereus* des échantillons ne sont pas tous égaux et il y a un effet de facteur significatif.

III- 2 : Résultat du test de corrélation

Le test de corrélation est fait entre le degré de contamination et la densité de la population. Le tableau 21 est le model traité sur XLSTAT.

Tableau 21 : Nombre d'UFC/g de *Bacillus cereus* contenu dans les échantillons en fonction de la densité de la population.

Marchés	Echantillons contaminés	UFC/g de <i>Bacillus cereus</i>	Densité de la population Nombre d'habitants/ Km ²
Andravoahangy	EAN3	954 = (0,9.10 ³)	19829
	EAN5	1090 = (1,1.10 ³)	19829
Analakely	EAK5	1227 = (1,2.10 ³)	26545
Isotry	EIS2	636 = (0,6.10 ³)	26545
67 HA	EHA3	1890 = (1,8.10 ³)	26545
Anosibe	EAB2	1072 = (1,1.10 ³)	16403
Mahamasina	EMA2	1245 = (1,2.10 ³)	16403

Source : Auteur, 2017

Le résultat obtenu après traitement sur XLSTAT est donné dans le tableau 22.

Tableau 22 : Résultat du test de corrélation de Pearson (test paramétrique)

Valeur observée	0,172
p-value bilatérale	0,713
Alpha	0,05

Source : Auteur, 2017

Ce tableau 22 indique qu'au seuil de signification $\alpha = 0,050$, l'hypothèse nulle d'absence de corrélation entre la densité de la population et la contamination des échantillons n'est pas rejeté.

IV- RESULTATS DU TEST D'ANTIBIOGRAMME

Les 07 souches de *Bacillus cereus* confirmées ont subi le test d'antibiorésistance. Le tableau 23 montre les résultats du test d'antibiogramme et la sensibilité des souches de *Bacillus cereus* vis-à-vis des familles et des antibiotiques de référence.

Tableau 23 : Résultats du test d'Antibiogramme

Souches	Familles des Phénicolés		Familles des Fluoroquinolones				Familles des cyclines		Familles des macrolides		Familles des sulfamides		Familles des aminosides		Sensibilité des souches de <i>Bacillus cereus</i>
	C		CIP		NOR		TET		E		TMP		GM		
	∅	C*	∅	C*	∅	C*	∅	C*	∅	C*	∅	C*	∅	C*	
BCEAN3	38	S	34	S	10	R	12	R	28	R	14	R	28	S	MR
BCEAN5	35	S	39	S	33	S	32	S	30	S	48	S	31	S	S
BCEAK5	46	S	22	S	10	R	19	S	20	R	11	R	38	S	MR
BCEIS2	32	S	35	S	28	S	14	R	16	R	10	R	32	S	MR
BCEHA3	31	S	46	S	36	S	38	S	50	S	12	R	35	S	S
BCEAB2	36	S	20	R	09	R	12	R	18	S	14	R	26	S	MR
BCEMA2	28	S	34	S	28	S	08	S	46	S	45	S	18	S	S

Source : Auteur, 2017

∅ = Diamètre d'inhibition en mm

C*= Catégorie ou interprétation de la sensibilité des souches par rapport au diamètre critique de référence

Le tableau 23 montre que parmi **07 souches testées**, 4 souches sont **multirésistantes** par rapport aux différentes familles d'antibiotiques, soit **57,14%** . Par contre, 3 souches parmi les 7 sont des souches **sensibles, soit 42,85%**.

La méthodologie et le mode d'interprétation des résultats selon la CA-SFM est donnée en annexe 8.

Les résultats du test d'antibiogramme des souches testées sont donnés en annexe 9.

La figure 12 montre l'antibiorésistance des souches de *Bacillus cereus* isolées dans les salades composées.

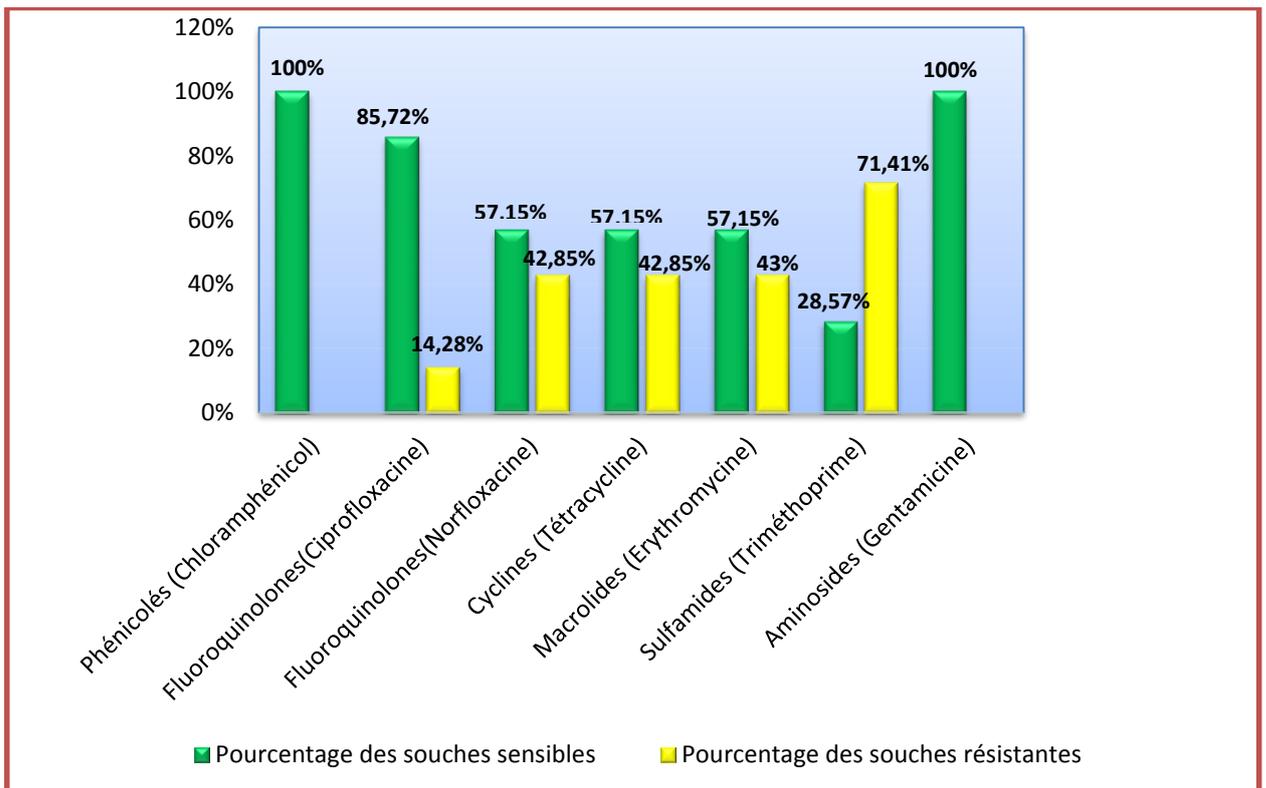


Figure 12 : Antibiorésistance des souches de *Bacillus cereus* isolées dans les salades composées

Source : Auteur, 2017

D'après la figure 12, la sensibilité des souches de *Bacillus cereus* vis-à-vis des différentes familles des antibiotiques est très différente.

- Toutes les souches sont sensibles aux antibiotiques des **familles des phénicolés** telles que les chloramphénicolés (100%) et **aux familles des aminosides** comme la gentamicine (100%).

- **Pour la famille des fluoroquinolones**, 85,72% des souches sont sensibles aux ciprofloxacines et 14,28% sont des souches résistantes. Au sein de ces familles d'antibiotiques même, 57,15% des souches sont sensibles aux Norfloxacines et 42,85% des souches sont résistantes. En somme, parmi les 07 souches étudiées 71,43% sont sensibles aux familles des fluoroquinolones.

- **Pour la famille des cyclines**, 57,1% des souches sont sensibles aux tétracyclines et 42,8% sont des souches résistantes.

- **Pour la famille des macrolides**, 57 % des souches sont sensibles à l'Erythromycine et 43% sont des souches résistantes.

- Un nombre important de souches ont manifesté une résistance élevée à la **famille des sulfamides** qui est la triméthoprine. Parmi les 07 souches testées, 28,57% sont sensibles et 71,43% sont résistantes.

Après les résultats obtenus par le test d'antibiogramme, parmi les 07 souches de *Bacillus cereus*, 03 souches ont été sensible aux divers antibiotiques de référence, soit 42,85% ; et 04 souches ont été confirmées comme souches multirésistantes, soit 57,14%. Ces souches multirésistantes sont :

- La souche **BCEAN3** isolée dans l'échantillon EAN3 du marché d'Andravoahangy.
- La souche **BCAK5** isolée dans l'échantillon EAK5 du marché d'Analakely.
- La souche **BCIS2** isolée dans l'échantillon EIS2 du marché d'Isotry.
- La souche **BCAB2** isolée dans l'échantillon EAB2 du marché d'Anosibe.

La figure 13 montre la répartition de la sensibilité des souches vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques de référence.

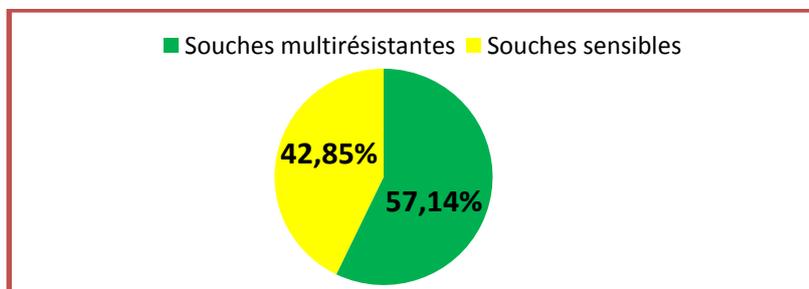
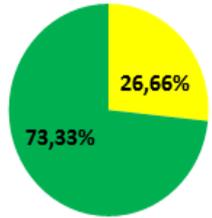
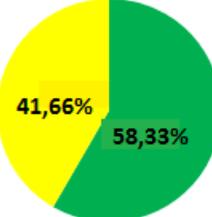
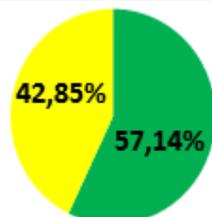


Figure 13 : Répartition de la sensibilité des souches isolées.

Le tableau 24 montre la récapitulation de notre travail au sein du laboratoire de Microbiologie de l'Université Athénée Saint Joseph Antsirabe.

Tableau 24 : Tableau récapitulatif

Qualités des échantillons des salades composées vendues sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo (Sur 30 échantillons)	73,33% Satisfaisante (22 échantillons)	26,66% Insatisfaisante (08 échantillons)	
Répartition des souches après test biochimique (Sur 12 souches)	58,33% <i>Bacillus cereus sensu stricto</i> (07 souches)	41,66% <i>Bacillus cereus sensu lato</i> (05 souches)	
Multirésistances des souches de <i>Bacillus cereus sensu stricto</i> (Sur 07 souches)	57,14% Multirésistantes (04 souches)	42,85% Sensibles (03 souches)	
Marchés	Les souches multirésistantes sont trouvés dans les échantillons vendus sur les marchés d' : - Andravoahangy - Analakely - Isotry - Anosibe	Les souches sensibles sont trouvés dans les échantillons vendus sur les marchés de : - Mahamasina - 67 Ha	
Antibiotiques les plus efficaces contre <i>Bacillus cereus</i>	- Famille des phénicolés (Chloramphénicol) - Famille des aminosides (Gentamicine)		

DISCUSSIONS

DISCUSSIONS

➤ Discussion par rapport à la qualité des salades composées vendues vis-à-vis de *Bacillus cereus*.

Lors de nos études, 07 souches de *Bacillus cereus* ont été isolées dans 07 échantillons parmi les 30 analysés, soit un taux de 23,33%. La présence de ces espèces dans les denrées alimentaires peut être due au manque d'hygiène, où bien à la contamination des matières premières utilisées (**Guinebretier et al., 2003**). En effet, l'espèce de *Bacillus cereus*, même si c'est une bactérie pathogène peut être qualifiée comme indicateur de contamination tellurique (**Carlin, 2011**).

Puisque *Bacillus cereus* est une bactérie ubiquitaire, elle est donc très abondante dans la nature et est capable de survivre et de se développer dans une multitude d'environnements, notamment dans le sol, la poussière aéroportée, l'eau, les sédiments ou les végétaux et les matières en décomposition. (**Logan et De Vos, 2009 ; Stenfors Arnesen et al., 2008**). Pour la santé publique, les vendeurs doivent utiliser des vitrines de sécurité des aliments vendus. Par contre, les vendeurs ne respectent pas les règles d'hygiènes alimentaires et contaminent les produits de différentes manières : par leurs mains sales, la mauvaise hygiène corporelle et vestimentaire ainsi qu'à l'insalubrité du plan et du matériel de travail comme les assiettes, fourchettes, couteau, éponge et aussi par l'utilisation des eaux de lavages souvent impropres.

Ainsi, la sécurité et la qualité hygiénique des plats servis aux consommateurs dépendent des contaminations initiales des matières premières (**Iboudo et al., 2009**), des possibilités de contaminations surajoutées à chaque étape du processus d'élaboration, de la possibilité de contamination résiduelle lorsqu'un traitement assainissant est appliqué et enfin des possibilités de multiplication des microorganismes présents dans les denrées (**Anonymous, 1982 ; Exen et Todd, 1985 ; Inal, 1992**). Une politique d'hygiène mal adaptée se traduira par une augmentation de la contamination biologique avec possibilité de développement de microorganismes pathogènes comme *Bacillus cereus* avec un risque de toxi-infection alimentaire (**Goussault, 1983 ; Rosset et al., 1983**).

Le dénombrement des souches de *Bacillus cereus* dans les salades composées vendues sur les marchés a donné des résultats peu satisfaisants. 26,66% échantillons prélevés étaient insatisfaisants, et 73,33% étaient satisfaisants. La présence des souches de *Bacillus cereus* dans les aliments témoigne de leur insalubrité et indique la contamination tellurique au niveau des marchés.

Sur nos 30 échantillons, nous avons mis en évidence la présence de 12 souches de *Bacillus cereus*. Selon les tests biochimiques réalisés sur ces souches, nous avons mis en évidence que 58,33 sont des vraies souches de *Bacillus cereus*. 25% sont des espèces phylogénétiquement apparentés à *Bacillus cereus*.

➤ **Discussion par rapport à la multirésistance de *Bacillus cereus***

Les souches de *Bacillus cereus* sont résistantes naturellement aux antibiotiques de la famille des β -lactamines, y compris les céphalosporines de troisième génération (Luna *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2012), mais sont sensibles à la Chloramphénicol, à la Clindamycine, à la Vancomycine, à la Ciprofloxacine, à l'Érythromycine, à la Gentamycine, à la Tétracycline et à la Streptomycine (Luna *et al.*, 2007 ; Chaves *et al.*, 2011 ; Chon *et al.*, 2012).

La Commune Urbaine d'Antananarivo est dotée par la présence des souches résistantes de *Bacillus cereus*. La mise en évidence des antibiorésistances des souches de *Bacillus cereus* isolées et identifiées a été réalisée par la technique de diffusion sur milieu gélosé MUELLER HINTON. Les résultats obtenus sur 07 souches montrent que 42,85% des souches sont résistantes à la Norfloxacine (10 μ g), 42,8% à la Tétracycline (30 μ g), 71,43% à Triméthoprime-sulfaméthazole (1,25+23,75 μ g). Ces souches ont donc des résistances acquises vis-à-vis des différentes familles d'antibiotiques. On dit qu'elles sont des souches multirésistantes. Ces résistances acquises pourraient s'expliquer par des modifications génétiques. Ainsi,

- **La résistance acquise à la famille des fluoroquinolones (Norfloxacine)**, pourrait être due par la mutation de l'ADN gyrase et de la topoisomérase (Willmott and Maxwell 1993).

- **La résistance acquise à la famille des cyclines (tétracycline)** est liée à l'acquisition de gènes de résistance portés par des éléments génétiques

mobiles, plasmides ou transposons conjugatifs (**Roberts 2003, 2005**). Ces gènes codent le plus souvent des systèmes d'efflux actif, des enzymes de protection ribosomale et des enzymes d'inactivation des molécules d'antibiotiques.

- **La résistance acquise à la famille des macrolides (Erythromycine)** est liée à la modification de la cible, il s'agit en fait d'une méthylation sur deux résidus alanine de l'ARN 23S de la sous unité 50S du ribosome bactérien. Comme la cible est modifiée, l'action de l'antibiotique est bloquée. Ce phénomène est très fréquent pour les macrolides, il est sous dépendance de la présence d'un gène plasmidique, le gène *erm* (pour méthylation du ribosome de l'érythromycine) codant pour une méthylase (enzyme ajoutant des groupements méthyls) (**Leclercq R. 2002**).

- **La résistance acquise à la famille des sulfamides (triméthoprime)** est liée au recrutement des gènes codant des dihydrofolates réductases (*dhfr*), par des mécanismes de transfert horizontal (**Skold 2001**). La grande dissémination des gènes *dhfr* chez les bactéries pathogènes s'explique par le fait qu'ils sont souvent retrouvés dans la nature comme gènes cassettes au sein des intégrons généralement associés à des éléments génétiques mobiles (**Sundstrom et al. 1988, Huovinen et al. 1995**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les aliments vendus sur la voie publique présentent un risque considérable du fait de la présence possible de microorganismes pathogènes pour les consommateurs. La vente nécessite un contrôle particulier afin de protéger la santé publique. Dans ce contexte, le but principal assigné à ce travail est basé sur deux aspects : le premier est l'analyse microbiologique des souches isolées à partir d'échantillons de salades composées vendues sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo et le deuxième est l'étude de la sensibilité des souches isolées vis-à-vis de certains antibiotiques utilisés en thérapeutique. La technique de diffusion en gélose utilisée pour l'étude de la résistance des souches a montré que 04 souches parmi 07 sont des souches multirésistantes.

La détection des souches multirésistantes de *Bacillus cereus* nous confirme l'insalubrité des salades composées vendues sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo. Ainsi, la préparation des aliments de rue de bonne qualité microbiologique exige des nombreuses règles d'hygiène à plusieurs niveaux qui pourraient réduire de façon significative l'incidence des maladies d'origine alimentaire. L'OMS en a retenu cinq (OMS, 2007) :

- Préparer les aliments avec des mains propres sur un plan de travail nettoyé ;
- Bien séparer les aliments crus et cuits ;
- Bien cuire les aliments ;
- Conserver la nourriture à une bonne température ;
- Utiliser une eau saine pour nettoyer les aliments.

Durant notre stage au sein de laboratoire de microbiologie à l'ASJA, l'étude de la multirésistance des souches de *Bacillus cereus* dans les salades composées vendues sur les marchés d'Antananarivo (marchés d'Andravoahangy, d'Analakely, d'Isotry – petite vitesse, de 67Ha, d'Anosibe et de Mahamasina) a permis de:

- Détecter des souches multirésistantes responsables des TIA et TIAC
- Nous initier aux manipulations microbiologiques,
- Etudier les sensibilités des antibiotiques,
- Nous familiariser aux utilisations des divers matériels de laboratoire,
- Acquérir et maîtriser des techniques de base en biotechnologie-microbiologie (Isolement, purification, conservation),
- D'utiliser les techniques d'identification des souches microbiennes.

Les perspectives d'avenir de ce travail consistent à :

- Renforcer les programmes de surveillance et de contrôle de l'alimentation de rue à Madagascar.
- Confirmer et localiser les gènes responsables de ces résistances aux antibiotiques par des techniques de la biologie moléculaire comme la (PCR) Polymérase Chaîne Réaction ;
- Trouver de nouvelles molécules actives, efficaces, d'origine naturelle contre *Bacillus cereus*.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Agata, N., Ohta, M., Yokoyama, K., 2002. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* 73, 23-27.
- [2] Agbobatinkpo, P. B., Thorsen, L., Nielsen, D. S., Azokpota, P., Akissoe, N., Hounhouigan, J. D. & Jakobsen, M. 2013. Biodiversity of aerobic endospore-forming bacterial species occurring in Yanyanku and Ikpuru, fermented seeds of *Hibiscus sabdariffa* used to produce food condiments in Benin. *Int J Food Microbiol*, 163, 231-238.
- [3] Albert I., Couvert O., De Buyser M - L., Denis C., Faille C., Gohar M., Leguerinel I., Lereclus D., Nguyen-The C., Sorokine A., Torny D. 2009. Etude de l'émergence d'une bactérie pathogène dans les filières alimentaires. Le cas de *Bacillus cereus* dans les produits non stériles traités thermiquement. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 24 N°4, 507-514.
- [4] Andersson, A., Rönner, U. & Granum, P. E. 1995. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology* 28, 145–155.
- [5] Andreu, M., and J. L. Mainardi. 2003. [What must one know about microbiology for prescribing antibiotics?]. *Rev Prat* 53: 1545-53.
- [6] Anonymous, 1982: Guidelines for Organization and Management of surveillance of foodborne Diseases. WHO. Geneva.
- [7] Bottone EJ. 2010. *Bacillus cereus*, a Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 382-+.
- [8] Carlin F. 2011. Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, 28 : 177-182.

- [10] **Ceuppens, S., Boon, N., Uyttendaele, M., 2013.** Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology* 84, 433-450.
- [11] **Chaves J.Q., Pires E.S., Vivoni A.M. (2011).** Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *International Journal of Food Microbiology*, **147** : 12-16.
- [12] **Chon J-W., Kim J-H., Lee S-J., Hyeon J-Y., Seo K-H. (2012).** Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiology*, **32** : 217-222. *Protection*, **72** : 612-617.
- [13] **Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. 1999.** *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing Period. *Journal of Dairy Science*, **82** : 305-314.
- [14] **Clark, F. E. 1937.** The Relation of *Bacillus siamensis* and Similar Pathogenic Spore-forming Bacteria to *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*, 33, 435-443.
- [15] **Collectif.** Résistance des microorganismes aux agents antibactériens. Le Manuel Vétérinaire Merck. 3rd ed Fr, Paris 2008 ; 2053-4.
- [16] **Contzen, M., Hailer, M. & Rau, J. 2014.** Isolation of *Bacillus cytotoxicus* from various commercial potato products. *Int J Food Microbiol*, 174, 19-22.
- [17] **Courvalin P.** La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull Acad Vét Fr.* 2008; 161(1):7-12.
- [18] **Decoster A, Lemahieu JC, Dehecq E, Duhamel M. Bactériologie.** 2008. Résistance aux antibiotiques. Faculté Libre de Médecine, Université Catholique de Lille.
- [19] **Douard G. 2011.** Mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert horizontal de l'îlot génomique de multi-résistance aux antibiotiques

Salmonella Genomic Island 1 [Thèse]. Santé, Sciences, Technologies : Tours-Nouzilly ; 172p.

- [20] Ehling-Schulz, M., Fricker, M., Scherer, S., 2004. Identification of emetic toxin producing *Bacillus cereus* strains by a novel molecular assay. *Fems Microbiology Letters* 232, 189-195.
- [21] Ewen C., Todd D, 1985 : Economie loss from foodborne disease outbreaks associated with food service establishments, *Journal Food Prot*, 48 (2): 169 – 180.
- [22] FAO ; 2009 ; Les enfants et l'alimentation de la rue. Disponible sur : <http://www.fao.org>
- [23] Goussault B, 1983 : Importance et rôle du contrôle microbiologique dans la restauration collective. *Informations techniques des vétérinaires*, Paris, 447p.
- [24] Guerin-Fauble V. Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. Journées Nationales des GTV, Lille, 26-27-28 juillet 2010, 93-102.
- [25] Guillemot D, Brisabois A, Brugere H, Guillot J F, Laval A, Milolemann Y et al. 2006. Usage vétérinaire des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. AFSSA.
- [27] Guinebretière M.H., Girardin H., Dargaignaratz C., Carlin F., Nguyen-The C. 2003. Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *International Journal of Food Microbiology*, 82 : 223-232.
- [28] Guinebretière MH & Nguyen-The C. 2003. Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini puree processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol Ecol* 43: 207-215.
- [29] Guinebretière MH, Auger S, Galleron N, et al. 2012. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a new thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group

occasionally associated with food poisoning. *Int J Syst Evol Microbiol* **17**: 17.

- [30] Guinebretière MH, Broussolle V & Nguyen-The C. 2002. Enterotoxigenic profiles of food-poisoning and food-borne *Bacillus cereus* strains. *J Clin Microbiol* **40**: 3053-3056.
- [31] Guinebretière MH, Thompson FL, Sorokin A, et al. 2008. Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology* **10**: 851-865..
- [32] Huovinen, P., L. Sundstrom, G. Swedberg, and O. Skold. 1995. Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 279-89.
- [33] Iboudo A., Savadogo A., Barro N., Ouedraogo M., Traore A, 2009 : Qualité hygiénique de la viande utilisée en restauration collective dans trois restaurants universitaires d'Ouagadougou (Burkina Faso). *Cahiers Santé* vol. 19, n°4.
- [34] Inal T, 1992 : Bensen hijyeni (Hayvansal Gidalarda Saghk Kontrolu) (foof hygiene Health inspection of food Obtained from Animals). Final Ofset, Istanbul.
- [35] J.L. Jouve. 1996. La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères. CNERNA-CNRS. Polytechnica éditions.
- [36] Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J. 2003.. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, **5** : 631-640.
- [37] Käferstein F. K. 1997. « Food safety: a commonly underestimated public health issue »; *World Health statistics Quaterly* ; 3-4 p.
- [38] Kotiranta, A., Lounatmaa, K., & Haapasalo, M. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes and Infection*, **2**(2), 189-198.
- [39] Kouamé, A. K., Djéni, T. N., N'Guessan, F. K. & Dje, M. K. 2013. Postprocessing microflora of commercial attieke (a fermented cassava

product) produced in the south of Côte d'Ivoire. *Lett Appl Microbiol*, 56, 44-50.

- [40] **Lechner S, Mayr R, Francis KP, et al. 1998.** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1373-1382.
- [41] **Leclercq R. 2002 [cited 2016 Nov 8].** Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clin Infect Dis* [Internet]. 34(4).
- [42] **Logan NA. 2012.** *Bacillus* and relatives in foodborne illness. *J Appl Microbiol* **112**: 417-429.
- [43] **Logan, N. A., & Rodrigez-Diaz, M. 2006.** *Bacillus* spp. and Related Genera. In S. H. Gillespie, & P. M. Hawkey (Eds.), *Principles and Practice of Clinical Bacteriology* (2nd ed., pp. 139-158). West Sussex, England, UK : John Wiley and Sons Ltd.
- [44] **Lopes, D., Nunes, C., Martins, M. C. L., Sarmiento, B. & Reis, S. 2014.** Eradication of *Helicobacter pylori*: Past, present and future. *Journal of Controlled Release*, 189, 169-186.
- [45] **Lozniewski A, Rabaud C.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins. Centre de Coordination et de lutte Contre Les Infections (CCLIN), Nancy. Juillet 2010.
- [46] **Lues, J. F., Theron, M. M., Venter, P. & Rasephei, M. H. 2007.** Microbial composition in bioaerosols of a high-throughput chicken-slaughtering facility. *Poult Sci*, 86, 142-9.
- [47] **Lugagne N. 2008.** Prévention de la diffusion des bactéries multirésistantes. Guide du risque nosocomial.
- [48] **Luna V.A., King D.S., Gulledege J., Cannons A.C., Amuso P.T., Cattani J. (2007).** Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etestagar

gradient diffusion methods. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **60** : 555-567.

- [49] **Magnusson M. 2007.** *Bacillus cereus* in the housing environment of dairy cows. Thèse de doctorat, Alnarp, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 46.
- [50] **Mainardi, J. L., M. Drancourt, J. M. Roland, J. L. Gestin, D. Raoult, J. F. Acar, and F. W. Goldstein. 1996.** *Bartonella (Rochalimaea) quintana* endocarditis in an Algerian farmer. *Clin Microbiol Infect* 1: 275-276.
- [51] **Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S., Kolchinsky Rainey F.A., Lo S.C. 1998.** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus* : Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** : 1236-1241.
- [52] **Massova, I., and S. Mobashery. 1998.** Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1-17.
- [53] **Mock M & Fouet A .2001.** ANTHRAX. *Annual Review of Microbiology* **55**: 647-671.
- [54] **Mortimer, P. R. & McCann, G. 1974.** Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet*, 1, 1043-5.
- [55] **Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., & Pfaller, M. A. (Eds.). 2007.** *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed.) American Society of Microbiology Press.
- [56] **Nakamura LK (1998)** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 1031-1035.
- [57] **OMS ; 1996 ; « Essential Safety Requirements for Street vended foods » ; Genève : Organisation Mondiale de la Santé (OMS) Food Safety Unit ; 41 p.**
- [58] **OMS ; 2001a ; « Salubrité des aliments » ; Rapport d'activité 2000 ; Genève : Organisation Mondiale de la Santé (OMS).**

- [59] OMS ; 2001b ; « Stratégie mondiale de l’OMS pour la salubrité des aliments » ; Genève : Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ; 8p.
- [60] OMS ; 2001c ; Choléra 2000 ; Rel épid. Hebd : 31 ; 233-240 p.
- [61] OMS Genève 2007; « Cinq clefs pour des aliments plus sûrs » ;
- [62] Park Y.B., Kim J.B., Shin S.W., Kim J.C., Cho S.H., Lee B.K., Ahn J., Kim JM., OhD.H. (2009). Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *Journal of Food*.
- [63] Philippon A. 2012. Résistance des bactéries aux antibiotiques. Faculté de Médecine Paris Descartes.
- [64] Philippon, A., J. Dusart, B. Joris, and J. M. Frere. 1998. The diversity, structure and regulation of beta-lactamases. *Cell Mol Life Sci* 54: 341-6.
- [65] Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Vermeulen, A., Andjelkovic, M., Fitz-James, I., in't Veld, P., Denon, Q., Verhe, R., Debevere, J., 2008. Heat resistance of *Bacillus cereus* emetic toxin, cereulide. *Letters in Applied Microbiology* 46, 536-541.
- [66] RANDRIANARIVELO H., 2014, « Evaluation de la qualité hygiénique d'un aliment de rue vendu dans les gargotes d'Ankatso : cas des composés », Faculté des sciences. Mémoire de DEA, 88p.
- [67] RAZAFY A. G. M., 1987, « Essai d'étude de l'impact de la vente ambulante d'aliments dans la ville d'Antananarivo ». Université d'Antananarivo, Faculté de médecine : Thèse de médecine, 79 – 86.
- [68] Roberts, M. C. 2003. Acquired tetracycline and/or macrolide-lincosamides-streptogramin resistance in anaerobes. *Anaerobe* 9: 63-9.
- [69] Roberts, M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 245: 195-203.
- [70] Rosset R et al., 1983 : L'analyse microbiologique interprétation des résultats. Informations techniques des services vétérinaires Paris.

- [71] Ruppé, E. 2010. Epidemiologie des beta-lactamases a spectre elargi : l'avenement des CTX-M. *Antibiotiques* 12: 3-16.
- [72] Sagong, H. G., Cheon, H. L., Kim, S. O., LEE, S. Y., Park, K. H., Chung, M. S., Choi, Y. J. & Kang, D. H. 2013. Combined effects of ultrasound and surfactants to reduce *Bacillus cereus* spores on lettuce and carrots. *Int J Food Microbiol*, 160, 367-72.
- [73] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, et al. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 775-+.
- [74] Scott G. 2009. Antibiotic resistance. *Medicine* ; 37(10) : 551-6.
- [75] Shinagawa, K., Ueno, Y., Hu, D.L., Ueda, S., Sugii, S., 1996. Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 1027-1029.
- [76] Skold, O. 2001. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Vet Res* 32: 261-73.
- [77] Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer, R. R., André G. (1997). Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, 7 : 201-205.
- [78] Smith, D. P., Berrang, M. E., Feldner, P. W., Phillips, R. W. & Meinersmann, R. J. 2004. Detection of *Bacillus cereus* on selected retail chicken products. *J Food Prot*, 67, 1770-3.
- [79] Stenfors Arnesen, L.P., Fagerlund, A., Granum, P.E., 2008. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *Fems Microbiology Reviews* 32, 579-606.
- [80] Sundstrom, L., P. Radstrom, G. Swedberg, and O. Skold. 1988. Site-specific recombination promotes linkage between trimethoprim- and sulfonamide resistance genes. Sequence characterization of dhfrV and sull and a recombination active locus of Tn21. *Mol Gen Genet* 213: 191-201.

- [81] **Swiecicka I., Van der Auwera G.A., Mahillon J. 2006.** Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microbial ecology*, **52** : 544-51.
- [82] **Vaerewijck M.J.M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B., Heyndrickx M. 2001.** Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, **91** : 1074-1084.
- [83] **Valero, M., HERNÁNDEZ-Herrero, L. A., Fernández, P. S. & Salmerón, M. C. 2002.** Characterization of *Bacillus cereus* isolates from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology*, **19**, 491-499.
- [84] **Vilain S., Luo Y., Hildreth M.B., Brözel V.S. 2006.** Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** : 4970-4977.
- [85] **Waksman, S. A. 1950.** Streptomycin and neomycin: an antibiotic approach to tuberculosis. *Br Med J* **2**: 595-600.
- [86] **Willmott, C. J., and A. Maxwell. 1993.** A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob Agents Chemother* **37**: 126-7.

ANNEXES

Annexe 1 : Matériels et équipement de laboratoire

Classes	Descriptions	Photos
VERRERIES	<p>Les boîtes de Pétri : ce sont des boîtes en verre ou en plastique de 90 à 100 mm de diamètre, et elles se recouvrent entre elle. Elles permettent d'effectuer une culture de microbienne.</p>	 <p>Photo 1 : Boîtes de Pétri</p>
	<p>Les tubes à essai : ce sont des tubes en verres de dimension et de longueur bien déterminés. Ils sont utilisés pour effectuer diverses réactions chimiques mais aussi des cultures microbiennes</p>	 <p>Photo 2 : Tubes à essai</p>
	<p>Les ballons : pouvant être à fond plat ou rond. Les ballons sont utilisés pour la préparation des milieux de culture, ou pour contenir diverses solutions</p>	 <p>Photo 3 : Ballons</p>
	<p>Les béchers : ils sont utilisés pour déterminer le volume approximatif d'un liquide. Ils peuvent avoir des tailles différentes selon leurs capacités.</p>	 <p>Photo 4 : Bécher</p>

Classes	Descriptions	Photos
VERRERIES	<p>Les éprouvettes graduées : elles servent à mesurer de façon précise un volume de liquide donné.</p>	 <p>Photo 5 : éprouvette</p>
	<p>- Les pipettes graduées et les micropipettes : ce sont des tubes gradués en verre ou en plastique utilisés pour mesurer de manière précise le volume d'un liquide (inférieur ou égale à 10 ml).</p> <p>- Les pipettes Pasteur : ce sont des tubes en verre sans graduation munis d'un bout très effilé. Elles sont utilisées pour prélever ou rajouter un très petit volume de liquide.</p>	 <p>Photo 6 : Pipettes</p>
PETITS MATERIELS	<p>Le bec Bunsen : c'est un bruleur relié à une bouteille à gaz. Il est constitué par le robinet, la virole et la cheminée. Toutes les manipulations bactériologiques se déroulent autour de la flamme du bec Bunsen (une zone délimitée par un rayon de 15 cm) dans le but d'assurer une meilleure asepsie).</p>	 <p>Photo 7 : Bec bunsen</p>
	<p>Le vortex : c'est un appareil servant à mélanger le contenu d'un tube à essai par une agitation rapide.</p>	 <p>Photo 8 : Vortex</p>

PETITS MATERIEL	Descriptions	Photos
	<p>La balance de précision : c'est un appareil utilisé pour peser de manière précise un échantillon donné.</p>	 <p>Photo 9 : Balance de précision</p>
	<p>La plaque chauffante agitateur magnétique : c'est un appareil de chauffage des milieux de culture déshydraté en milieux de culture préalablement utilisés.</p>	 <p>Photo 10 : Plaque chauffante</p>
	<p>Un gant : utilisé lors de la préparation des milieux de culture, sert à porter les ballons surchauffés.</p>	 <p>Photo 11 : Gant</p>
	<p>Une spatule : c'est un matériel en inox utilisé lors de la préparation de la suspension mère et la préparation des milieux de culture.</p>	 <p>Photo 12 : Spatule</p>



Classes	Descriptions	Photos
GROS MATERIELS	<p>Hotte à flux laminaire : c'est un appareil dans lequel sont effectuées toutes les manipulations microbiologiques. Elle assure le maintien d'une atmosphère stérile durant toute la manipulation. Elle protège également le manipulateur contre les contaminations.</p>	 <p>Photo 13 : Hotte à flux laminaire</p>
	<p>Autoclave : c'est un appareil utilisé pour stériliser les boîtes de Pétri ou tubes, contenant les cultures microbiennes dont le but de tuer les endospores.</p>	 <p>Photo 14 : Autoclave</p>
	<p>Etuve : c'est un appareil utilisé pour la stérilisation des matériels comme les verreries (cas des étuves pour stérilisation)</p>	 <p>Photo 15 : Etuve</p>
	<p>Un incubateur : c'est un appareil utilisé pour l'incubation des cultures microbiennes</p>	 <p>Photo 16 : Incubateur</p>



Annexe 2 : Composition des réactifs

➤ Composition des réactifs pour la coloration Gram

• VIOLET DE GENTIANE

Violet cristal	1 g
Alcool à 95°	10 ml
Acide phénique	2 g
Eau distillée	100 ml

• LUGOL

Iode	3 g
Iodure de potassium	9 g
Eau distillée	900 ml

• FUSCHINE DE ZIEHL

Fuschine basique	0,3 g
Alcool 95°	10 ml
Phénol cristallisé	5 g
Eau distillée	95 ml

➤ Compositions du réactif de Griess pour le test de nitrate

α-naphtylamine	0,5 g
Acide acétique à 30%	200 ml
Acide sulfanilique	0,5 g
Eau distillée	50 ml



Annexe 3 : Composition et préparation des milieux de culture

➤ Milieux de culture

- **Milieu sélectif : Gélose sélective pour *Bacillus cereus* (Selon MOSSEL) Formule typique complet pour 1 litre de milieu.**

Composition	En g/l
Tryptone	10,0 g
Extrait de viande	1,0 g
D – mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium	10,0 g
Rouge de phénol	25,0 mg
Emulsion stérile de jaune d'œuf	100,0 mL
Polymyxine B	1.10 ⁵ UI
Agar agar bactériologique	13,5 g

pH du milieu prêt –à-l 'emploi à 25°C = 7,2 ± 0,2

Préparation :

- Mettre en suspension 44,5 g de milieu de base déshydraté dans 0,9 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons, à raison de 90 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

- **Milieux électif**

❖ **Milieu PCA (Plate Count Agar) : utilisé lors du test respiratoire**

Composition	En g/l
Tryptone	5,0 g
Extrait autolytique de levure	2,5 g
Glucose	1,0 g
Agar-agar bactériologique	12,0 g

pH du milieu prêt –à-l 'emploi à 25°C = 7 ± 0,2

Concentration : 20,5g/l



❖ Milieu de Mueller Hinton : utilisé pour le test antibiogramme

Composition	En g/l
Extrait de bœuf	3 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon	1,5 g
Agar agar bactériologique	15 g

pH du milieu prêt –à-l'emploi à 25°C = 7,2 ± 0,2

Concentration de 35 g/l.

➤ Les milieux d'identification

• Milieu Hajna-Kligler

Composition	En g/l
Peptone	15 g
Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone pepsique de viande	5 g
Glucose	1 g
Lactose	10 g
Rouge de phénol	25 mg
Chlorure de sodium	5 g
Sulfate ferreux	0,2 g
Thiosulfate de sodium	0,3 g
Agar agar bactériologique	11 g

pH du milieu prêt –à-l'emploi à 25°C = 7,5

Concentration 53.5 g /l

• Milieu Lysine-fer

Composition	En g/l
Peptone de gélatine	5,0 g
Extrait de levures	3,0 g
L-lysine	100 g
Glucose	1,0 g
Citrate de fer III ammoniacal	0,5 g
Bromocrésol pourpre	20,0 mg
Thiosulfate de sodium	40,0 mg



Agar agar bactériologique	13,5 g
---------------------------	--------

pH du milieu prêt –à-l'emploi à 25°C = 6,7
Concentration de 33 g/l.

- **Milieu Mannitol-Mobilité-Nitrate**

Composition	En g/l
Hydrolysate tryptique de caséine	10,0 g
Mannitol	7,5 g
Rouge de phénol	0,4 mg
Nitrate de potassium	1,0 g
Agar	3,5 g

pH du milieu prêt –à-l'emploi à 25°C = 7,6
Concentration : 22 g/l

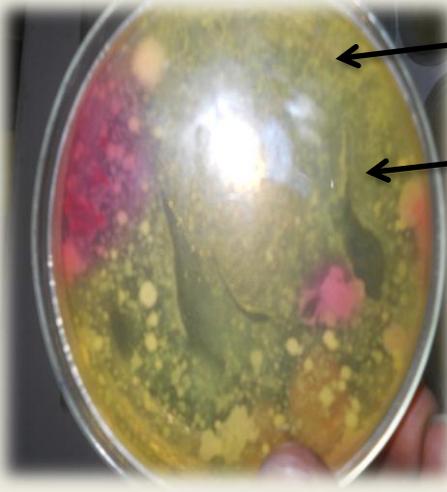
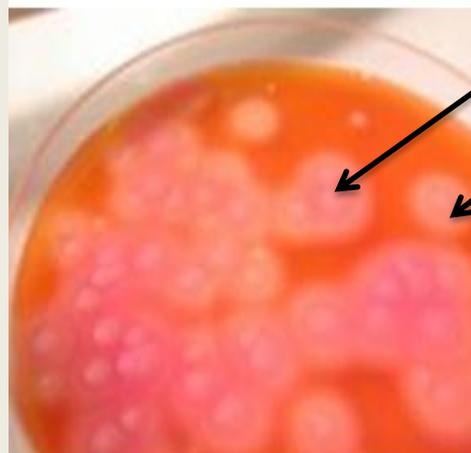
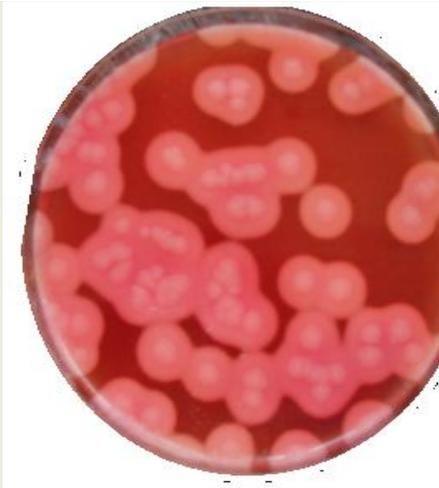
- **Milieu Citrate de Simmons**

Composition	En g/l
Citrate de sodium	1,0 g
Bleu de bromothymol	0,08 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Hydrogénophosphate de potassium	1,0 g
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1,0 g
Agar	15,0 g

pH du milieu prêt –à-l'emploi à 25°C = 7,1
Préparation avec une concentration de 21g/l

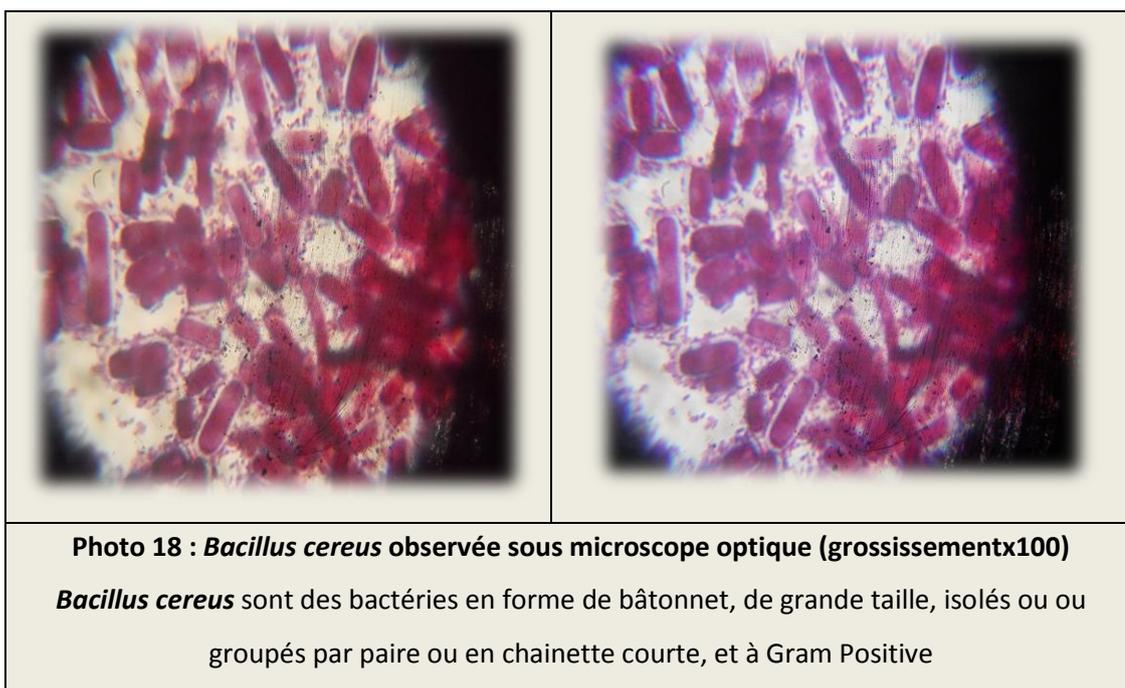


Annexe 4 : La colonie des souches présumées de *Bacillus cereus*

	<p>Colonie jaune → Utilisation du mannitol par les <i>Bacillus</i> → MANNITOL +</p> <p>Absence d'un halo opaque autour de la culture → les lécithines n'ont pas été hydrolysées par les <i>Bacillus</i>.</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>Il s'agit d'un <i>Bacillus</i> autre que <i>Bacillus cereus</i></p>
	<p>Colonies rouges entourées d'un halo opaque et blanchâtre → suspicion de <i>Bacillus cereus</i>, LECITHINASE +++</p> <p>Colonies rouges → pas d'utilisation de mannitol par les bactéries → MANNITOL -</p> <p>Présence d'un halo: hydrolyse des lécithines par une lécithinase, en choline soluble et diglycéride insoluble qui précipite dans le milieu en formant un trouble.</p> <p>Source : Anonyme</p>
	
<p style="text-align: center;">Photo 17 : Colonies des <i>Bacillus cereus</i> sur milieu MOSSEL</p>	

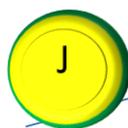


Annexe 5 : La morphologie des souches de *Bacillus cereus*



Annexe 6 : Les principales caractéristiques des espèces du groupe *Bacillus cereus*

Caractéristiques	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus Thuriangiensis</i>	<i>Bacillus Antracis</i>	<i>Bacillus weihenste phanensis</i>	<i>Bacillus Mycoïdes</i>	<i>Bacillus pseudo-mycoïdes</i>	<i>Bacillus cytotoxicus</i>
T° min de croissance	10°C	10°C	>10°C	5°C	5°C	10°C	20°C
T° max de croissance	45°C	45°C	<50°C	37°C	37°C	40°C	50°C
Catalase	+	+	+	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-
Production d'Indole*	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase du jaune d'œuf	+	+	+	+	+	+f	+f
Amidon**	+	+	+	+	+	+	-



Caractéristiques	<i>Bacillus Cereus</i>	<i>Bacillus Thuriengiensis</i>	<i>Bacillus Anthracis</i>	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	<i>Bacillus Mycoïdes</i>	<i>Bacillus pseudo-mycoïdes</i>	<i>Bacillus cytotoxicus</i>
Hémolyse	+	+	-	ND	+	+	ND
Croissance en anaérobiose	+	+	+	+	+	+	+f
Réductions des nitrates*	+	+	+	+	+	+	+
Colonie rhizoïdale	-	-	-	-	+	+	-
Cristal parasporal	-	+	-	-	-	-	-

f : faiblement positif ; ND : non déterminé ; *Tests API 20E ; **Tests API 50 CH

Source : (Souches types) *Ces caractéristiques peuvent varier selon les groupes phylogénétiques. (Guinebretière et al.,2013 ; Nakamura,1998; Thorsen L. et al.,)*

Selon **Guinebretière.**, ces 7 espèces s'avèrent difficiles à différencier par les méthodes normalisées en vigueur (NF EN ISO 7932, NF EN ISO 21871). En effet ces espèces ne sont pas clairement séparées génétiquement.

Selon **Priest et coll.** *B.anthraxis*, *Bacillus cereus* sensu stricto et *B.thuringiensis* ne différencieraient que sur certains caractères pathogènes portés par des plasmides. Elles devraient donc être considérées comme une seule et même espèce.

Les méthodes moléculaires ont permis de définir 7 groupes phylogénétiques (I à VII), dont certains sont divisés en 2, 3 ou 4 sous-groupes au sein desquels sont distribuées les souches de *Bacillus cereus* (sensu lato). Les souches d'une même espèce peuvent appartenir à un ou plusieurs groupes phylogénétiques. (**Guinebretière et coll.**). Les groupes diffèrent sur :

- Leur capacité à se développer à différentes températures : Psychrotolérantes (capacité à se développer à 4-5°C) : groupes II, V, VI ; Mésophiles (croissance optimale à 10-45°C): groupes III et IV ; Thermotolérantes (capacité à se développer à 50°C) groupe VII, représenté par *B.cytotoxicus*.
- La thermo-résistance de leurs spores ;
- Leur pouvoir pathogène.



Annexe 7: La lecture des résultats de *Bacillus cereus* sur les milieux d'identification.

Tube témoin = avant incubation

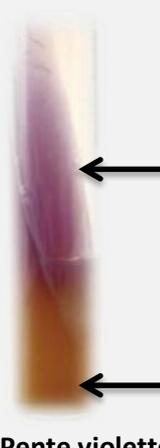
Tube expérimentale = après incubation

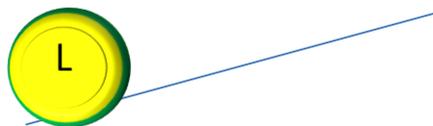
Photo 19 : Photos sur les milieux d'identification.

➤ **Lecture sur le milieu Hajna Kligler**

Tube témoin	Tube expérimental
 <p style="text-align: center;">Milieu de couleur rouge</p>	 <p style="text-align: center;">Pente rouge Culot jaune</p> <p style="text-align: center;">Pente rouge : lactose – Culot jaune : Glucose +</p>

➤ **Lecture sur le milieu Lysine Fer**

Tube témoin	Tube expérimental	
	 <p style="text-align: center;">Pente violette Culot jaune</p> <p style="text-align: center;">Pente violette : LDA – Culot jaune : LDC –</p>	 <p style="text-align: center;">Pente violette Culot violette</p> <p style="text-align: center;">Pente violette : LDA – Culot violette : LDC +</p>



➤ Lecture sur le milieu Mannitol Mobilité Nitrate

Tube témoin	Tube experimental
 <p data-bbox="421 954 716 987">Milieu de couleur rouge</p>	 <p data-bbox="975 535 1267 568">Surface rose</p> <p data-bbox="975 629 1289 663">Milieu trouble</p> <p data-bbox="975 752 1270 786">Milieu rouge</p> <p data-bbox="922 920 1337 1023"> Surface rose : Nitrate réductase + Milieu trouble : mobilité + Milieu rouge : Mannitol - </p>

➤ Lecture sur le milieu Simmons citrate

Tube témoin	Tube expérimental
 <p data-bbox="421 1850 716 1883">Milieu de couleur verte</p>	 <p data-bbox="916 1850 1342 1883">Virage du milieu en bleu : citrate +</p>



Annexe 8 : Méthodologie et interprétation des résultats du test d'antibiogramme selon CA-SFM 2014.

Conditions techniques générales pour les méthodes de diffusion

1- Introduction

La méthode de diffusion est l'une des plus anciennes approches de détermination de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques et demeure l'une des méthodes les plus utilisées en routine. Elle convient pour la majorité des bactéries pathogènes incluant les bactéries à croissance lente ; elle permet une variété dans le choix des antibiotiques et ne requiert aucun matériel particulier. Comme la plupart des techniques de diffusion en gélose, la méthode de l'EUCAST est standardisée, se fonde sur les principes définis dans le rapport de l'International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing (1972) mais aussi sur l'expérience des experts du monde entier. Les diamètres critiques de la méthode EUCAST sont établis en fonction des concentrations critiques européennes publiées par EUCAST et accessibles gratuitement sur le site de l'EUCAST (<http://www.eucast.org>). Comme dans toute méthode, les techniques décrites doivent être suivies sans aucune modification de façon à obtenir des résultats corrects.

2- Préparation des milieux

- 2.1 Préparer la gélose de MH selon les indications du fabricant en ajoutant, pour les bactéries à croissance lente, les suppléments pour la gélose au sang MH-F. La préparation et l'addition des suppléments sont décrites en détail : <http://www.eucast.org>.
- 2.2 L'épaisseur de la gélose doit être de 4 mm \pm 0,5 mm (approximativement 25 mL pour une boîte de 90 mm de diamètre, 31 mL pour une boîte de 100 mm de diamètre, 71 mL pour une boîte de 150 mm de diamètre et 40 mL pour une boîte carrée de 100 mm de côté.
- 2.3 La surface de la gélose doit être séchée avant emploi. Les conditions de séchage et de conservation des milieux fabriqués au laboratoire sont



fonction de l'équipement du laboratoire et doivent être déterminées localement. Les boîtes ne doivent pas être desséchées.

- 2.4 Conserver les boîtes préparées au laboratoire à 8-10°C. Si elles sont conservées au-delà de 7 jours, les conserver à 4-8°C en sachet plastique scellé.
- 2.5 Les conditions de séchage et de conservation des milieux fabriqués au laboratoire doivent être déterminées localement dans le cadre du programme d'assurance qualité.
- 2.6 Il convient de suivre les recommandations du fabricant pour le mode de conservation des géloses prêtes à l'emploi. Les utiliser avant péremption.

3. Préparation de l'inoculum

- 3.1 Réaliser une suspension bactérienne directement à partir des colonies en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ 1 à 2 x10⁸ UFC/mL pour *Escherichia coli*. Cette méthode convient pour toutes les bactéries y compris à croissance lente dont : *Haemophilus* spp. *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae*, les streptocoques β -hémolytiques. Réaliser une culture sur milieu non sélectif. Le lendemain, prélevé plusieurs colonies de même morphologie (si possible) afin d'éviter de sélectionner un variant atypique. Mettre ces colonies en suspension en milieu salé avec une öse stérile ou un écouvillon en coton.
- 3.2 La suspension bactérienne est standardisée à l'aide du témoin 0,5 Mc Farland. Un inoculum lourd engendre des diamètres plus petits et inversement.
 - 3.2.1 Il est recommandé d'employer un spectrophotomètre pour ajuster l'inoculum. Cet appareil doit être calibré contre un étalon de la gamme de McFarland selon les recommandations du fabricant.
 - 3.2.2 On peut également comparer à l'oeil nu la turbidité de la suspension bactérienne à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de



McFarland. Dans ce cas agiter vigoureusement l'étalon de turbidité sur un VortexR avant usage (certains étalons commerciaux sont gélifiés et ne doivent pas être agités; suivre les recommandations du fabricant). Pour faciliter la comparaison des deux échantillons, se placer face à un fond blanc avec des lignes noires.

3.2.4 Pour ajuster la densité bactérienne au tube 0,5 McFarland, ajouter soit la solution salée soit les bactéries.

3.3 La suspension bactérienne doit être employée de façon optimale dans les 15 min. sans jamais dépasser 60 min.

4. Inoculation des géloses

4.1 L'inoculum bactérien doit idéalement être employé dans les 15 min. qui suivent sa préparation. Son emploi doit être fait au plus tard dans les 60 min. qui suivent sa préparation.

4.2 Plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne et éliminer l'excès de liquide en tournant l'écouvillon sur les parois du tube. Il est important de rejeter l'excès de liquide sur l'écouvillon pour éviter une sur-inoculation des boîtes, en particulier pour les bactéries à Gram négatif.

4.3 Ecouvillonner sur la totalité de la surface de la gélose dans trois directions ou en utilisant un ensemenceur rotatif.

4.4 Déposer les disques dans un délai de 15 min.

Si les boîtes sont abandonnées à la température du laboratoire trop longtemps avant le dépôt des disques la bactérie peut commencer à croître conduisant à une fausse diminution de la taille des zones d'inhibition.

5. Dépôt des disques imprégnés d'antibiotique

5.1 Les charges des disques sont indiquées dans les Tableaux où figurent les concentrations critiques et le contrôle de qualité.



5.2 Déposer les disques fermement à la surface de la gélose inoculée et séchée. Le contact avec la surface doit être étroit. Les disques une fois déposés ne peuvent être déplacés car la diffusion des antibiotiques est très rapide.

5.3 Le nombre de disques déposés par boîte est limité du fait du chevauchement des zones d'inhibition et pour limiter les interférences entre les antibiotiques. Il est important que les diamètres des zones d'inhibition soient mesurables. Le nombre maximum de disques est fonction de la bactérie et des antibiotiques car certains entraînent pour des souches sensibles, des zones très larges. Un maximum de six disques convient pour les boîtes de 90 mm de diamètre et douze (ou seize) pour celles de 150 mm de diamètre.

Les disques d'érythromycine et de clindamycine doivent être placés à une distance de 12-20 mm bord à bord afin de détecter la résistance inductible aux lincosamides, chez les staphylocoques et les streptocoques.

5.4 La décharge des disques conduit à des zones d'inhibition réduites et constitue une source d'erreur habituelle. D'où :

5.4.1 Conserver les disques, y compris ceux en cartouches dans des conteneurs fermés avec un dessiccateur et à l'abri de la lumière (certains agents comme le métronidazole, le chloramphénicol et les fluoroquinolones sont inactivés en cas d'exposition prolongée à la lumière)

5.4.2 Conserver les disques à -20°C sauf indication contraire du fabricant. Si cela n'est pas possible conserver les disques à une température inférieure à 8°C.

5.4.3 Placer le matériel pour les tests à une température inférieure à 8°C.

5.4.4 Pour éviter la condensation, laisser les disques revenir à la température ambiante avant d'ouvrir les cartouches.

5.4.5 Ne pas utiliser de disques périmés.



6. Incubation des boîtes de Petri

- 6.1 Retourner les boîtes et dans les 15 min. qui suivent le dépôt des disques, les incuber. Si elles sont abandonnées à température ambiante après dépôt des disques, la pré-diffusion des antibiotiques engendrera des zones d'inhibition faussement agrandies.
- 6.2 L'empilement des boîtes dans l'étuve peut affecter les résultats en raison des différences de température liées au système de chauffage et de ventilation. L'efficacité des étuves est variable, aussi le contrôle des paramètres de l'incubation y compris le nombre de boîtes par pile doivent être tracés et font partie du programme de l'assurance qualité du laboratoire.
- 6.3 Incuber les boîtes comme indiqué dans le Tableau 3.
- 6.4 Pour les glycopeptides et certaines souches d'entérocoques les colonies résistantes n'apparaissent qu'après une période de 24 h pleine d'incubation. Il est possible d'effectuer la lecture après 16 à 20 h et de répondre quand la souche est résistante ; en cas de sensibilité, il y a lieu d'incuber à nouveau puis de lire à 24 h.

7. Lecture des boîtes après incubation

- 7.1 Un inoculum et un ensemencement corrects doivent conduire à une culture confluyente.
- 7.2 La culture doit être répartie sur toute la surface de la gélose de façon à obtenir des zones d'inhibition circulaires.
- 7.3 La présence de colonies isolées indique que l'inoculum est trop faible. Refaire le test.
- 7.4 Vérifier que les diamètres des zones d'inhibition sont dans les limites du contrôle de qualité

8. Mesure des zones d'inhibition et catégorisation clinique

- 8.1 La bordure de la zone d'inhibition doit être lue à l'oeil nu et au niveau de la complète inhibition de la culture ; la boîte étant placée à 30 cm de l'oeil.

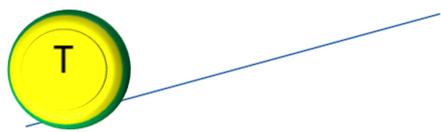


- 8.2 Lire les zones d'inhibition au dos des géloses **MH** sur fond noir éclairé par une lumière réfléchie.
- 8.3 Lire les zones d'inhibition sur géloses **MH-F** directement face à la boîte, couvercle retiré, éclairée par une lumière réfléchie.
- 8.4 Ne pas tenir les boîtes face à une lampe (lumière transmise) ni employer une loupe grossissante (sauf cas particulier, voir infra).
- 8.5 Mesurer les diamètres des zones d'inhibition au millimètre le plus proche avec une règle, un pied à coulisse ou un système de lecture automatisé.
- 8.6 Interpréter les diamètres des zones d'inhibition par référence aux Tableaux où figurent les concentrations critiques.



Annexe 9 : Résultat du test d'Antibiogramme des souches détectées

	<p>← C'est une souche sensible à l'érythromycine (E) et au ciprofloxacine (CIP). Mais elle est résistante au triméthoprimé (TMT) et au tétracycline (TET)</p>
	<p>Sensible : présentation d'un halo d'inhibition de $\varnothing \geq D$</p> <p>Résistant : pas d'un halo d'inhibition ou avec halo d'inhibition de $\varnothing < d$</p> <p>Halo d'inhibition</p> <p>← Diamètre du halo d'inhibition</p>
<p>Photo 20 : Photo des résultats du test d'antibiogramme</p>	
	<p>C'est une souche multi- résistante vis-à-vis des antibiotiques de différentes familles.</p> <p>CIP : Ciprofloxacine (famille des fluoroquinolones)</p> <p>TMT : Triméthoprimé (famille des sulfamides)</p> <p>TET : Tétracycline (famille des cyclines)</p> <p>E : Erythromycine (famille des macrolides)</p>



Annexe 10 : PRESENTATION DE LA VILLE

La Commune Urbaine d'Antananarivo, située au cœur d'Antananarivo, Capitale de Madagascar est dirigée par Madame le Maire d'Antananarivo Lalao RAVALOMANANA. Etant la plus vaste et la plus importante en termes de densité de la population, la Commune urbaine d'Antananarivo est divisée en six arrondissements pour une meilleure administration de la ville :

POPULATION DU 1^{er} ARRONDISSEMENT

- Délégué : Mr RAZAFIMBELO Arinosy Jacques
- Superficie : 8,9146 Km²
- Population : 236 521
- Densité de la population : 26 545/Km²

Le 1^{er} arrondissement est composé de 44 quartiers. 21% de la population Tananarivienne y vivent. Il est délimité au nord par le quartier d'Antohomadinika, au Sud par Ambatovinaky, à l'est par Ampandrana, et à l'ouest par Andohatapenaka I.

POPULATION DU 2^e ARRONDISSEMENT

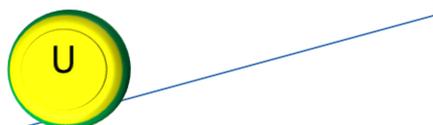
- Délégué : Mr RAZAFINDRAIBE Solo Nirina Jacques
- Superficie : 23,05 Km²
- Population : 163 423
- Densité de la population : 7 098/Km².

Le 2^{ème} arrondissement est composé de 24 quartiers. Il est délimité au Nord par le Quartier d'Ampasanimalo, au sud par Andronrakely, à l'Est par Ambolokandrina, à l'Ouest par Manjakamiadana.

POPULATION DU 3^e ARRONDISSEMENT :

- Délégué : Mme RAZAFINIRINA Hantalalao Jocelyne
- Superficie : 6,829 Km²
- Population : 135 416
- Densité de la population : 19 829 /Km²
- 34 quartiers composent le 3^{ème} arrondissement. 12 % de la population y vivent.

Le 3^{ème} arrondissement est délimité à l'est par Ankatso, au nord par Andravoahangy, au sud par Antanimena et à l'ouest par Ankorondrano.



POPULATION DU 4^e ARRONDISSEMENT :

- Délégué : Mr RATSISETRAINA David Aimé
- Superficie : 12,95 Km²
- Population : 212 411
- Densité de la population : 16 403 /Km²

32 quartiers composent le 4^e arrondissement et 17% de la population y vivent. Au Nord, il est délimité par le quartier de Tsimialonjafy Mahamasina ; au sud par Anosimahavelona ; à l'est par Ankaditoho ; et à l'ouest par Anosipatrana.

POPULATION DU 5^e ARRONDISSEMENT :

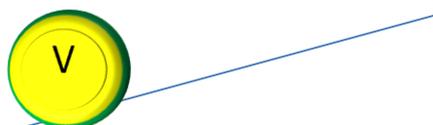
- Délégué : Mr RAKOTO Emmanuel Honoré Richard
- Superficie : 23,05 Km²
- Population : 303 437
- Densité de la population : 13 Km

Au nord, le 5^{ème} arrondissement, est délimité par le quartier d'Analamahitsy ; au sud, Ambodivona ; à l'est par Mahazo ; et à l'ouest par le quartier de Soavimasoandro. Cet arrondissement est composé par 27 quartiers, et 27% de la population y vivent.

POPULATION DU 6^e ARRONDISSEMENT :

- Délégué : Mr ANDRIAMANANJEZIKA Fehizoro
- Superficie : 16, 77 km²
- Population : 117 690
- Densité de la population : 7 017/ km²

16 quartiers composent le 6^{ème} arrondissement et de 10% de la population y vivent. Au Nord, il est délimité par le quartier d'Andraharo ; au Sud par Ankasina ; et à l'Ouest par le quartier d'Avaratanana Ambatolampy.



Author : RAMIANDRIARIVELO Zo Anjaramarotia
Address : Lot II E 69 VE Tsarahonenana - Andraisoro
E – mail : ramzymartiz@gmail.com
Advisor : Doctor TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina

Title: "Evaluation of the contamination with multiresistantes strains of *Bacillus cereus*, in the composed salads sold on the markets in Urban Commune of Antananarivo."

ABSTRACT

In the Urban commune markets of Antananarivo, the "composed salads" play an important role in the human nutrition. However, they can represent a risk of toxi-infection for the consumers. The food poisoning to *Bacillus cereus* results from the ingestion of the emetic toxins or entérotoxines produced by the vegetative cells. The objective of this survey was to verify the microbiological quality of the "composed salads" sold on the markets of Andravoahangy, Analakely, Isotry, 67 ha, Anosibe and Mahamasina. The results showed that 26,66% of the samples are of dissatisfactory qualities and 73,33% are of satisfactory qualities. The presumptive isolats of *Bacillus cereus* was the subject of identification by biochemical tests and the tests of antibioresistances. So, work undertaken in the setting of this memory allowed us to detect the presence of the true stumps of *Bacillus cereus sensu stricto* isolated in 04 samples. These are the original BCAN3, BCAA5, BCIS2 and BCAB2. A Resistance against currently used antibiotics has been established for these multiresistantes strains that could be incriminated in the collective food toxi-infections (TIAC). For it, the antibiotics family of the phenicoles (Chloramphénicol) and of the aminoglycosides (Gentamicine) are the most efficient against *Bacillus cereus*.

Key words: *Bacillus cereus*, multiresistance, TIAC, composed salads, Urban Commune of Antananarivo, antibiotics.

Auteur : RAMIANDRIARIVELO Zo Anjaramarotia
Adresse : Lot II E 69 VE Tsarahonenana – Andraisoro
E – mail : ramzymartiz@gmail.com
Encadreur : Docteur TSIRINIRINDRAVO Herisetra Lalaina

Titre : « Evaluation de la contamination par des souches multirésistantes de *Bacillus cereus*, des salades composées vendues sur les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo».

RESUME

Dans les marchés de la Commune Urbaine d'Antananarivo, les salades composées jouent un rôle important dans la nutrition humaine. Cependant, ils peuvent représenter un risque de toxi-infection pour les consommateurs. L'intoxication alimentaire à *Bacillus cereus* résulte de l'ingestion des toxines émétiques ou des entérotoxines produites par les cellules végétatives. L'objectif de cette étude était de vérifier la qualité microbiologique des salades composées vendues sur les marchés d'Andravoahangy, d'Anakely, d'Isotry, de 67 ha, d'Anosibe et de Mahamasina. Les résultats ont montré que 26,66% des échantillons sont de qualités insatisfaisantes et 73,33% sont de qualités satisfaisantes. Les isolats présomptifs de *Bacillus cereus* ont fait l'objet d'une identification par des tests biochimiques et des tests d'antibiorésistances. Ainsi, Le travail entrepris dans le cadre de ce mémoire nous a permis de détecter la présence des vraies souches de *Bacillus cereus sensu stricto* isolées dans 04 échantillons. Ce sont les souches BCAN3, BCAF5, BCIS2 et BCAB2. Un profil de résistance vis-à-vis des antibiotiques couramment utilisés a été établi pour ces souches multirésistantes pouvant être à l'origine des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Pour cela, les antibiotiques de la famille des phénicolés (Chloramphénicol) et des aminosides (gentamicine) sont les plus efficaces contre *Bacillus cereus*.

Mots clés : *Bacillus cereus*, multirésistance, TIAC, salades composées, Commune Urbaine d'Antananarivo, antibiotiques.