

# Université Ahmed Draïa-Adrar

Code:



Faculté des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master en :

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

## Thème

**Les bases des analyses microbiologiques dans le  
domaine sanitaire et alimentaire**

Préparé par :

M<sup>elle</sup> *MORGHAD Chima*

M<sup>elle</sup> *FELOUAH Souheila*

M<sup>elle</sup> *ALIOUAT Hassna*

Membres de jury d'évaluation:

Mr. Idder Boubaker	Président	MCB	Univ. Adrar
Mr. Abekhti Abdelkader	Encadreur	MCA	Univ. Adrar
Mr. Bouslah yahia	Examineur	MCB	Univ. Adrar

Année universitaire : 2021/2022

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
People's Democratic Republic of Algeria

Ministry of Higher Education and  
Scientific Research  
University Ahmed Draia of Adrar  
The central library



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
جامعة أحمد دراية - أدرار  
المكتبة المركزية  
مصلحة البحث البيولوجي

## شهادة الترخيص بالإيداع

انا الأستاذ(ة): أرفني عبد القادر  
المشرف مذكرة الماستر الموسومة بـ: Les bases des analyses microbiologique: dans le domaine sanitaire et alimentaire

من إنجاز الطالب(ة): خلوات حنة ، قلع سحر

و الطالب(ة): مرفا شياد

كلية: العلوم والتكنولوجيا

القسم: علوم الطبيعة والحياة

التخصص: بيوكيمياء التطبيقية

تاريخ تقييم / مناقشة: 18/06/2022

أشهد ان الطلبة قد قاموا بالتعديلات والتصحيحات المطلوبة من طرف لجنة التقييم / المناقشة، وان المطابقة بين النسخة الورقية والإلكترونية استوفت جميع شروطها.  
وبإمكانهم إيداع النسخ الورقية (02) والأليكترونية (PDF).

- امضاء المشرف:

ادرار في: .....

مساعد رئيس القسم:



أرفني عبد القادر

# Dédicace

*La présentation de ce modeste travail m'offre l'occasion d'exprimer ma  
profonde gratitude au premier lieu*

*Dieu tout puissant qui ne cesse de me protéger, merci seigneur de  
m'accorder ta bénédiction à travers ma soutenance.*

*À l'homme, de ma vie Cher père Décédé trop tôt ,Qui m'a toujours poussé  
et motivé dans mes études ,C'était son rêve de voir sa petite chère en ce  
jour J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet  
humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a  
toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant,  
l'avoir en sa sainte miséricorde*

*Fredj*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir, qui n'a jamais  
dit non à mes exigences et qui n'a épargné aucun effort pour  
me rendre heureuse : la prunelle de mes yeux*

*Daouia*

*À mon encadreur, Mr \* ABekhti Abdelkader\* je tenais vivement à vous  
remercier pour l'encadrement et tous les conseils dont j'ai pu bénéficier au  
cours de cette année que j'ai eu l'opportunité de passer à vos côtés.*

*À mes chères sœurs \* Zhor , Leila, Ibtissam , Djahida, Halima \*et Mes  
chers frères \* Mohmmed, Khaled ,Abd elaziz \*Ceux qui ont partagé avec  
moi tous les*

*moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail*

*A ma Chère grand-mère paternelle*

*\* Nana Kharfia \**

*À Mon très cher tonton \* Abdelkader\* qu'Allah te préserve de tout mal*

*À mon adorable petite cousine \*Bouchra \**

*À ma douce cousine \* Omaïma \**

*À mes beaux frères \* Ahmed\* et \*Hamza\**

*À Mes belles sœurs \*Fatna \* , \*Nawal \* et \*Hanane \**

*À mes chers nièces et neveux*

*À mon adorable grande sœur \* Aïcha \**

*qui était toujours à mes cotés,*

*À \*Lakhdar \*ma source de positif vibes*

*À mes collègues \*abdelhak.ch \* \*Abd elrahman .H \*et \*Djahida .A \**

*A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à  
maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements,*

*• Sans oublier mon binômes \*Hassna \* et*

*\* Souhila \* pour leurs soutien moral, ses*

*Patiences et ses compréhensions tout au long de ce projet*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit  
de votre soutien infaillible,*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

**CHIMAA**

# Dédicace

*À celle qui est restée debout, élevée et fatiguée A la fontaine  
qui ne se lasse pas de donner A celle qui a tissé mon bonheur  
avec les fils tissés de son cœur à ma chère mère  
À ceux qui s'efforcent et sont misérables de jouir du confort et  
du contentement, qui n'ont rien lésiné pour me pousser sur le  
chemin du succès.  
À mon cher père  
À ma deuxième mère et mon soutien dans la vie.  
À ceux qui m'ont appris à gravir les échelons de la vie avec  
sagesse et patience.  
À ma chère soeur Soumia  
À qui leur amour coule dans mes veines et fait allusion à leur  
mémoire de mon cœur.  
A mes chères sœurs, Marwa et Anfal. Mon seul frère, Fayçel  
A mon beau frère , le propriétaire de l'esprit correct et de la  
pensée éclairante Abbas.  
A la source du bonheur ma nièce Rassil.  
Au sourire et à la joie Yannis.  
À ceux qui ont marché ensemble alors que nous ouvrons  
ensemble la voie vers le succès et la créativité.  
Pour le groupe Salsoli, Je remercie en premier lieu Aichaoui  
Djahida  
Et Aichaoui Warda , Rettat Loubna , Haddadi.A , cherifi.A ,  
Amraoui.A et Remerciement spécial à jiji .A,  
À ceux qui Se sont donnés à main .. pour cueillir une fleur,  
nous avons appris.  
À mes amis et collègues dans ce travail, Hassna et chaima.  
Au professeur encadrant qui n'a pas lésiné sur nous en conseils  
et consignes  
Dr Abekhti Abdelkader.  
À tous ceux qui m'ont enseigné une lettre dans ce monde  
mortel.  
À tous ceux qui ont oublié le stylo et sauvé le cœur  
À tous, je dédie cet humble travail, et j'espère qu'il sera accepté  
et couronné de succès.*

## **Dédicace**

*Avant toute chose, nous remercions Dieu, le tout puissant, pour  
m'avoir donné la force.*

*À celui qui m'a laissé en esprit et ne m'a pas laissé en corps, à  
celui qui illumine tout ma vie de sa présence 'La paix et la  
miséricorde soient sur une tombe qui t'embrasse, mon plus chère  
qui est parti( messaoud).*

*À qui sa supplication m'a soutenu, et son amour était une lampe  
qui a illuminé mon chemin et mon avenir, au cœur qui bat en moi,  
ma maman chérie ( litim messaouda )*

*À ma deuxième mère. À celle qui s'est occupée de mon avenir  
plus que moi.. Elle a été mère avant d'être une soeur.. Fayza. À  
ma jumelle Houda.. À mon soutien dans la vie mes soeurs Fatima,  
Khadidja, Houriya, ouahiba, et Meriem.*

*À ma sûreté, mes frères Boudjemaa, Mohamed et kada, à la joie  
de la maison, nos petits-enfants, tous en son nom.*

*À ceux qui ont contribué à mon succès... ma tante Daouia, à mes  
amis, tous en son nom, et à ma famille en étude (Salsoli)*

*Je n'oublie pas qui était l'humérus et le soutien pour mener à bien  
mon mémoire, mes collègues Chaima et Sohaila  
Sans oublier le professeur et l'encadreur Abdelkader abakhti  
Qui a joué le plus grand rôle en nous soutenant et en nous  
fournissant les informations précieuses  
Je vous dédie cette Mémoire*

**HASSNA**



## **Remerciements**

*On remercie dieu le tout puissant de nous avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait*

*pas pu avoir le jour sans l'aide et l'encadrement de Mr Abekhti Abdelkader*

*, on le remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur et sa disponibilité*

*turant notre préparation de ce mémoire.*

*Nos remerciement s'adresse également à tout nos professeurs Mr Boussah yahia , Mr Idder Boubaker pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

# ***Résumés***

### **Résumé :**

Dans notre étude, nous allons aborder «Les bases fondamentales des analyses microbiologiques » pour rechercher et identifier les microorganismes (bactéries, champignons microscopique, virus et protozoaires...) dans le domaine Alimentaire et Médical.

Ces analyses sont des successions des étapes suivantes : échantillonnage, prélèvement, transport et identification des germes après le traitement d'échantillon. Les analyses sont réalisées pour définir la qualité d'aliment et pour mettre en place un traitement approprié pour les patients (homme et animaux). Les techniques d'analyses sont en développement continu pour automatiser les protocoles analytiques, améliorer les méthodes d'analyses pour répondre aux besoins de rapidité et d'exactitude des résultats.

Les mots clé : Echantillon, prélèvement, dilution et identification.



### ملخص :

في دراستنا, سنتناول "الاسس الاساسية لتحليلات الميكروبيولوجية" للبحث عن الكائنات الحية الدقيقة والتعرف عليها (البكتيريا والفطريات المجهرية والفيروسات والاوليات,..) في مجال الغذاء والطب. هذه التحليلات هي سلسلة من الخطوات التالية : اخذ العينات والجمع والنقل وتحديد الجراثيم بعد معالجة العينة يتم اجراء التحليلات لتحديد جودة الطعام ولاعداد العلاج المناسب للمرضى (البشر والحيوانات). يتم تطوير التقنيات التحليلية باستمرار لاثمة البروتوكولات التحليلية , وتحسين الاساليب التحليلية لتلبية احتياجات سرعة ودقة النتائج.

الكلمات المفتاحية: العينة, اخذ العينات, التخفيف, التحديد.

**Summary :**

*In our study, we will approach “The fundamental bases of microbiological analyses” to search for and identify microorganisms (bacteria, microscopic fungi, viruses and protozoa, etc.) in the Food and Medical field.*

*These analyzes are a succession of the following steps: sampling, collection, transport and identification of germs after sample processing. Analyzes are carried out to define the quality of food and to set up an appropriate treatment for patients (humans and animals). Analytical techniques are constantly being developed to automate analytical protocols, improve analytical methods to meet the needs for speed and accuracy of results.*

*Key words: Sample, sampling, dilution and identification..*

## *liste des tableaux*

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<i>1</i>	Tubes de culture utiles pour le travail en microbiologie	<i>16</i>
<i>2</i>	Récipients spécifiques utiles pour le travail en microbiologie	<i>17</i>
<i>3</i>	Récipients non spécifiques utiles pour le travail en microbiologie	<i>17</i>
<i>4</i>	Table de préconisation du matériel de prélèvements	<i>31</i>
<i>5</i>	Prélèvement bactériologique	<i>35</i>

## *liste des figures*

<i>N°</i>	<i>Titre</i>	<i>Page</i>
<b>Fig.1:</b>	Antoni van Leeuwenhoek.	<i>2</i>
<b>Fig.2:</b>	Les étapes d'analyse microbiologie alimentaire.	<i>9</i>
<b>Fig.3:</b>	Autoclave 430X420.	<i>10</i>
<b>Fig.4:</b>	Stérilisation par membrane filtre.	<i>11</i>
<b>Fig.5:</b>	Les lampes UV.	<i>12</i>
<b>Fig.6:</b>	Hottes à flux laminaire.	<i>12</i>
<b>Fig.7:</b>	Etuve 311X253.	<i>13</i>
<b>Fig.8:</b>	Jarre anaérobies.	<i>13</i>
<b>Fig.9:</b>	Four à micro-ondes 225X463.	<i>14</i>
<b>Fig.10:</b>	Réfrigérateur 439X500.	<i>14</i>
<b>Fig.11:</b>	Récipients 305X564.	<i>18</i>
<b>Fig.12:</b>	Divers system de broyage/homogénéisation.	<i>19</i>
<b>Fig.13:</b>	Précédé de numération par filtre sur membrane.	<i>26</i>
<b>Fig.41:</b>	Les étapes d'analyses microbiologies médicales.	<i>32</i>
<b>Fig.41:</b>	Coloration de Gram.	<i>38</i>
<b>Fig.41:</b>	Test d'identification virale par immunofluorescence en culture de tissu, (a) deux noyaux infectes par le cytomégalovirus (CMV) dans une culture de tissu positive. (b) plusieurs cellules infectées par le virus herpes simplex	<i>39</i>

	dans des culture cellulaire.	
<b>Fig.41:</b>	Parasite par l'observation microscopique ( <i>Trypanosoma sp.</i> ).	<b>41</b>
<b>Fig.41:</b>	Typage phagique de <i>Staphylococcus aureus</i> (lysotypie) Une culture en bouillon de <i>S. aureus</i> estensemencée sur une gélose nutritive, et différents phages sont déposés selon un plan prédéfini. Après incubation, le profil de lyse indique le lysotype de la souche (gélose nutritive, 18 h à 37°C).	<b>42</b>
<b>Fig.41:</b>	Test de sensibilité à la bacitracine, les bactéries à gauche sont présumées être des streptocoques du groupe A, inhibées par l'antibiotique bacitracine, les bactéries à droite ( <i>Enterococcus faecalis</i> ) sont résistantes à la bacitracine.	<b>42</b>

## Sigles et abréviations

<b>µm</b>	Micro mètre
<b>AFNOR</b>	Association Française de Normalisation
<b>d</b>	Pourcentage De Défaut
<b>DGCCRE</b>	Direction générale de concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes.
<b>DIN</b>	<i>Deutscher Institut für Normung</i> (Norme Allemande).
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>FAMT</b>	Flore Aérobie Mésophile Totale.
<b>g</b>	Gramme
<b>ISO</b>	Organisation Internationale de Normalisation
<b>ml</b>	Millilitre.
<b>mm</b>	Millimètre.
<b>n</b>	Nombre D'éléments A Echantillonner.
<b>Na Cl</b>	Chlore Sodium
<b>NF</b>	Norme Française
<b>NPP</b>	Nombre De Germes Le Plus Probable.
<b>Ø :</b>	Diamètre.
<b>OGA</b>	: Probabilité De Décélérer Le Défaut
<b>p</b>	Gélose Oxytétracycline-Glucose
<b>PCR</b>	Polymérase Chain Réaction
<b>pH</b>	Potentiel Hydrique
<b>pp</b>	polypropylène.
<b>TNTM</b>	Technique De Numération En Tubes Multiples
<b>UV</b>	Lumière Ultraviolette

## Sommaire

Dédicace .....	I
Dédicace .....	II
Dédicace .....	III
Remerciements.....	IV
Résumés.....	IV
liste des tableaux .....	VIII
liste des figures.....	IX
Sigles et abréviations .....	XI
Sommaire .....	XII
Introduction.....	1

### Généralité

<b>Généralité .....</b>	<b>2</b>
1- Description Globale Des Techniques Classiques Et Modernes Utilisées Dans L'identification Microbienne .....	2
2- Les Domaines D'activité Des Microbiologistes.....	5
3- L'objectif d'analyse microbiologique .....	6
I. Synthèse Bibliographique.....	1

### Chapitre I: Les analyses microbiologique des aliments

1- Description Générale De L'analyse Microbiologique Des Denrées Alimentaires: .....	8
2- Principes .....	9
1. Les Instruments Des Analyses Microbiologique Des Aliments: .....	10
3-1- Systèmes de stérilisation/désinfection et zones stériles .....	10
3-2- Matériels D'incubation Et De Préparation Des Milieux:.....	13
3-3-Matériels Pour La Préparation Des Echantillon: .....	18
3-4- Microscopes Optiques: .....	19
3-5- Compteurs De Colonies: .....	19
4-Les Etapes Des Analyses Microbiologique Alimentaire.....	20
4-1- Echantillonnage Et Prélèvement .....	20
4-1- Fréquence des Prélèvements.....	22
4-2-Traitement De Echantillon .....	22
4-2-1- Conditions De Conservation Et De Transfert De L'échantillon Au laboratoire .....	22
4-2-2- Préparation De L'échantillon .....	23

4-3- Diluants .....	23
4-4 Revivification (liquide, solide) .....	24
4-5-Techniques D'Analyse .....	24
4-5-1- Analyse Microscopique.....	25
4-5-2- Analyse Quantitative:.....	25
4-5-3- Analyses Qualitative Et Recherche Des Germes Pathogènes .....	27
4-5-4- Analyses Complémentaires .....	28

## **Chapitre II: les analyses microbiologique médicale**

1- Définition.....	29
2- Principe D'analyse Microbiologique Médicale: .....	29
3- Les Matériels Des Analyses Microbiologiques Médicales.....	29
4- Les Etapes Des Analyses Microbiologique De Médicale: .....	32
4-1- Prélèvement: .....	33
4-2- Manipulation.....	36
4-3- Transporte Des Echantillons .....	36
4-4- Identification Des Microorganismes.....	36
4-4-1- La Microscopie .....	37
4-4-2- Croissance Et Les Caractères Biochimiques.....	37
4-4-3- Techniques Immunologiques (antigène/anticorps).....	41
4-4-4- Typage Par Phages (lysotypie) .....	41
4-4-5- Test De Sensibilité .....	42
4-4-6- Ordinateurs En Microbiologie Clinique.....	43
Conclusion .....	44
Référence Bibliographique .....	45



# *Introduction*

### **Introduction**

Les micro-organismes sont l'ensemble des organismes vivant invisibles à l'œil nu (bactéries, champignons microscopique, parasites, virus...). Ils sont probablement les premiers organismes apparus sur la terre depuis plusieurs milliard d'années ; avant même l'apparition des plantes et des animaux.

Les études des analyses microbiologiques consistent à isoler et identifier les microorganismes, allant du prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats.

Dans l'ensemble des chapitres de ce mémoire, nous avons tenté d'étudier "**Les bases fondamentales des analyses microbiologiques**" et leurs principales aires de développement et leur devenir dans les prochaines futures.

Le travail en sa globalité décrit les principales étapes d'analyse microbiologique. Le premier chapitre présente les analyses microbiologiques alimentaires et l'objectif de cette analyse, le deuxième chapitre développe les méthodes et les techniques utilisées dans les laboratoires médicales.

# *Chapitre I :* *Généralité*

## Généralité :

### 1- Description Globale Des Techniques Classiques Et Modernes Utilisées Dans L'identification Microbienne :

La découverte de l'existence des microorganismes, ne pouvait se faire sans l'avènement de progrès dans le domaine des sciences exactes. Une contribution importante a été apportée par Galilée, qui en 1610 n'a pas seulement construit un télescope mais aussi un dispositif optique, l'*occialino*, pour examiner des objets petits (Cornu, 2000). Mais c'est un siècle plus tard que Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723) fut le premier à décrire les "animalcules" (vraisemblablement des levures et les plus grosses bactéries) (Prescott & Harley & Klein, 2007). Toutefois, van Leeuwenhoek était très réticent à la diffusion de sa technique.



fig. 1: Antoni van Leeuwenhoek (Prescott & Harley & Klein, 2007).

A la fin du XVIIIème siècle, l'Allemand Otto Friedrich Müller (1730-1784) confirma l'existence des bactéries. En 1773 Müller décrivit de nombreuses bactéries et les classa en genres et en espèces.

Bien avant la découverte des flores alimentaires de détérioration, l'homme a découvert qu'il pouvait prolonger la conservation des aliments (viandes, poissons, fruits, légumes), en les séchant, en les salant, en les fumant Le sel fut longtemps une denrée essentielle pour ses propriétés de conservation.

Aristote recommandait à Alexandre Le Grand d'imposer à ses troupes de faire bouillir l'eau avant de la boire.

Les expériences de Spallanzani avaient permis de montrer qu'on pouvait éviter la putréfaction et la fermentation à l'aide ces travaux (stérilisation) ont suscité une application médicale dont les conséquences ont été considérables pour éviter les infections postopératoires.

Dès les années 1850, Philippe-Ignace Semmelweis (1818-1865): Démontré que la fièvre puerpérale se transmet par les médecins et propose d'utiliser des antiseptiques pour prévenir la maladie. Pasteur démontre que la fermentation du sucre en acide lactique est due à un microorganisme (Prescott & Harley & Klein, 2007). Et réalisa qu'il pouvait distinguer les contaminants qui causaient la perte du vin. Il a alors supposé qu'en chauffant le vin à 50°C pour

détruire les mauvais microbes, procédé par la suite universellement employé sous le nom de pasteurisation (**Cornu, 2000**).

Enfin, en 1867, Joseph Lister (1827-1912), établit les principes de l'antisepsie, à laquelle devait par la suite se substituer la conception moderne de l'asepsie des produits même les plus périssables. Ce procédé fut largement utilisé, bien avant que les bases scientifiques de la stérilisation ne soient établies chirurgicale.

Cohn: Etablir une classification systématique de toutes les bactéries, fondée sur la morphologie mais en tenant compte aussi de leur métabolisme. Son grand ouvrage de systématique, "*Untersuchungen über Bactérien*" parut en 1872. La taxonomie bactérienne a été complétée et modifiée à de nombreuses reprises. Les classifications fondées sur des critères morphologiques. Par la suite, d'autres introduisirent de nouveaux critères, d'ordre immunologique ou biochimique. De Migula en 1894 et Lehmann & Neumann en 1896 sont comme celle de Cohn essentiellement.

Au début du XIX<sup>ème</sup> siècle, la microbiologie s'est essentiellement tournée vers un objectif appliqué: La lutte contre les maladies infectieuses.

En la fin de 1870, Koch, médecin de campagne s'est intéressé au charbon, et développé progressivement et techniques de base réussit à isoler la bactérie du charbon. A côté de la spécificité du "parasite", celle de l'hôte était clairement établie et illustrée par la résistance naturelle du chien et des oiseaux au charbon expérimental cela signifie que si les trois règles énoncées sont respectées, alors la présence du parasite chez un organisme malade ne peut être une coïncidence et que la seule relation qui puisse être considérée est que le parasite est la cause de la maladie. Les trois règles sont les suivantes:

- Le parasite est présent dans chaque cas de la maladie en question et dans des conditions en relation avec la pathologie.
- Le parasite n'est présent, comme parasite fortuit et non pathogène, dans aucun autre cas de maladie.
- Le parasite peut être **isolé** de l'organisme malade et propagé en **culture pure**, et il est peut alors induire la maladie à nouveau (chez un organisme sain).

Dans le domaine des techniques bactériologiques, on peut attribuer à Koch ou à ses collaborateurs : les techniques de culture aseptique, les cultures pures, l'utilisation de boîtes de Pétri, la boucle d'inoculation, la coloration de Gram et d'autres techniques de coloration.

Les premiers milieux de culture étaient liquides, ce qui rendait très difficile l'isolement de bactéries en cultures pures.

En 1881, Koch décrit l'utilisation de pommes de terre bouillies découpées avec un couteau stérilisé comme premier milieu de culture solide.

Par la suite, Koch décida d'essayer de solidifier le milieu de culture peptoné à base d'extrait de viande de son associé, Loeffler.

En 1882, l'épouse d'un assistant de Koch et Hesse, l'agar fut donc utilisé pour la première fois comme agent solidifiant, un autre assistant de Koch et Pétri, inventa la boîte de culture qui porte son nom et plus personne n'utilisa les plaques de verre.

Les travaux de Winogradsky et Beijerinck se chevauchent chronologiquement et se complètent. En 1888, Beijerinck a isolé en culture pure les bactéries fixatrices de l'azote et symbiotes des légumineuses. En 1890-91, Winogradsky a isolé les bactéries nitrifiantes et démontré que celles-ci se subdivisent en deux groupes, l'un oxydant l'ammoniaque en nitrite, l'autre oxydant le nitrite en nitrate. Peu après, en 1895, Winogradsky a découvert les bactéries anaérobies fixatrices de l'azote, vivant à l'état libre dans le sol (*Clostridium pasteurianum*). L'approche de Winogradsky et Beijerinck est couramment opposée à celle de Koch. Pourtant, cette première présentation de leur travail peut conduire à penser que les principes diffèrent peu puisqu'ils ont *isolé* des agents responsables de phénomènes jusqu'alors non expliqués. Une première différence réside dans la méthode d'isolement grâce à la méthode des cultures d'enrichissement sur gélose qui consiste à ensemercer un échantillon de sol ou de tout autre milieu naturel dans un milieu où la substance dont on veut étudier le métabolisme est la seule source possible d'énergie, de carbone ou d'azote; dans les conditions sélectives. Controverse entre Kluyver et Winogradsky d'une part *versus* Ierusalmsky et Hungate d'autre part. Bien que de nombreuses observations aient pu être réalisées à partir d'études en culture pure au laboratoire, celles-ci n'en demeurent pas moins artificielles du fait que dans le milieu naturel, ces bactéries vivent en communautés, entre elles ou avec des organismes supérieurs.

L'importance de Pasteur et à moindre échelle de Koch dans l'essor de la microbiologie ne peut être occultée. Toutefois, aux yeux de Panikov (1995), elle ne devrait pas masquer les découvertes et surtout les apports méthodologiques de Winogradsky et Beijerinck. Ils ont introduit les techniques d'enrichissement et Winogradsky a également introduit la pratique de la culture continue (Cornu, 2000).

## 2- Les Domaines D'activité Des Microbiologistes :

Selon la norme européenne 406-1990, la microbiologie est définie comme "la discipline scientifique traitant des propriétés des micro-organismes, comprenant les bactéries, les champignons, les parasites et les virus et de leurs effets sur l'hôte et l'environnement".

Ainsi que cette discipline comprend plusieurs domaines d'application comme : Microbiologie médicale, moléculaire, biopharmaceutique, industrielle, agroalimentaire et environnementale. (Cornu, 2000).

- **Microbiologie médicale et Santé publique:** Étude des microorganismes pathogènes (virulence et pathogénicité, maladies infectieuses, méthodes de diagnostic, réponse immunitaire, résistance aux antibiotiques, évaluation de l'efficacité des traitements). Mais embrasse également l'épidémiologie, la pathogénèse, le traitement et la prévention des maladies infectieuses. Bien que l'incidence des maladies microbiennes ne soit pas très élevée dans les pays développés, les épidémies d'infections restent encore inquiétantes. Ils œuvrent dans les hôpitaux, les agences et les institut de santé publique et l'industrie pharmaceutique (Shears & Hart, 1997).

- **Microbiologie moléculaire (génétique):** Étude des rôles et des fonctions des gènes chez les microorganismes (physiologie et métabolisme, génétique, identification et développement des molécules microbiennes utiles en biotechnologie). Ils œuvrent principalement dans les institutions de recherche et dans l'industrie des biotechnologies (<http://www.sciencepresse.com>).

- **Microbiologie biopharmaceutique:** Mélange de microbiologie médicale et moléculaire dans une optique industrielle (développement de nouveaux antibiotiques, antiviraux et de vaccins, production de composés pour la fabrication de médicament) (<http://www.sciencepresse.com>).

- **Microbiologie industrielle:** Utilisation du système enzymatique des microorganismes pour synthétiser ou dégrader une grande variété de produits (industrie des pâtes et papier; production de produits chimiques; extraction de minéraux; filtration des eaux; production de cosmétiques) (<http://www.sciencepresse.com>). Et contrôlée microbiologiquement sur des produits à usage ménager (détergents, produits assouplissants...), des matériaux plastiques entrant en contact avec les aliments (bouchons en plastique) ou des produits cosmétiques (huiles végétales, produits de gommage...) à la demande des industriels locaux (Perry & Staley & Lory, 2004).

- **Microbiologie agroalimentaire:** Utilisation de micro-organismes dans la production et la transformation des aliments (étude du rôle des micro-organismes dans la production maraîchère et animale, dans la conservation des aliments, fermentation du fromage, yogourt, vin, bière, production de *probiotiques et prebiotiques*, asepsie des produits) (<http://www.sciencepresse.com>).

### 3- L'objectif d'analyse microbiologique :

Les analyses microbiologiques permettent de mettre en évidence et de quantifier les microorganismes (Prescott & Harley & Klein, 2007).

Il devrait ainsi vous permettre de réaliser les différents analyses et les divers contrôles indispensables à la maîtrise de la qualité des produits alimentaires mais aussi de la qualité hygiénique de l'environnement de production et de distribution (Cuq, 2007).

- **Les analyses microbiologiques des aliments:**

Nos aliments sont soumis à des contaminations diverses par les micro-organismes de l'environnement. Si ceux-ci rencontrent dans l'aliment les conditions nécessaires à leur croissance, ils vont s'y multiplier et provoquent différents types d'altération.

La qualité hygiénique sera altérée si le micro-organisme en se multipliant rend l'aliment dangereux pour la santé publique : c'est le cas d'une *Salmonella* qui se multipliant dans un pâte, produit chez le consommateur une toxi-infection alimentaire (Mouffok, 2000).

Les analyses microbiologiques portent principalement sur le produit fini, mais aussi sur les matières premières (produits, emballages, eaux de process ...), le matériel et les installations, les surfaces de machine, l'air ambiant des locaux, les locaux...

Les moyens utilisés au cours de ces analyses sont pour les pluarts simples, la complexité vient de l'importance de microorganisme recherché. Certains aliments nécessitent des outils particuliers pour réaliser le prélèvement. Ce type d'analyse commence dans le lieu de production ou de vente et finit au niveau du laboratoire d'analyse. Le transport des échantillons prélevés exige des conditions adéquates pour assurer la stabilité microbiologiques des aliments à analyser.

D'ordre générale, l'analyse microbiologique des aliments répond aux deux objectifs suivants :



**L'expertise** : pour déterminer l'étiologie d'une intoxication d'origine alimentaire.

**La prévention** : pour s'assurer de la qualité hygiénique des produits alimentaires (**Ait Abdeluoahab, 2007**).

- **Les analyses microbiologiques médicales et vétérinaires :**

Le principal objectif d'un laboratoire de microbiologie clinique est l'identification et la caractérisation rapide et précise du pathogène impliqué dans une infection (**Perry & Staley & Lory, 2004**). Les organismes pathogènes, souvent cohabitent avec des micro-organismes inoffensifs à la surface ou dans l'hôte. Ces organismes pathogènes doivent être identifiés correctement comme agents étiologiques de la maladie infectieuse. C'est le but de la microbiologie clinique qui identifie ces micro-organismes à l'aide de procédés morphologiques, biochimiques, immunologiques et moléculaires, le temps requis pour l'identification est un facteur important, surtout lorsque la vie de malades est en jeu. Des outils et des méthodes d'identification rapides sont maintenant disponibles sur le marché, à l'aide des microbiologistes cliniciens. Les méthodes moléculaires contribuent à l'identification de micro-organismes sur la base des propriétés génomiques et biochimiques très spécifiques. Dès qu'ils sont isolés et identifiés, les microorganismes peuvent alors être soumis à des tests de sensibilité antimicrobienne (ATB) (**Prescott & Harley & Klein, 2007**).

***I. Synthèse  
Bibliographique***

# ***Chapitre II***

## ***Les analyses microbiologique des aliments***

La microbiologie, connu un essor exceptionnel vu le nombre indéterminé des techniques d'analyse et d'identification qui ne cesse de renouveler et de bouleverser les connaissances sur les microorganismes. Les techniques microscopiques et celles de culture ont été les premières pratiques à la disponibilité des chercheurs. Cependant les microbiologistes ont vite connu les limites de ces outils car ils ne permettent pas d'aborder tous les aspects liés aux mondes microbiens.

Globalement, les techniques d'étude des microorganismes sont classées en trois principaux groupes qui sont : la microscopie, les méthodes immunologique, les méthodes d'identification biochimique et physiologique (Kabali et al., 2021)

## 1- Description Générale De L'analyse Microbiologique Des Denrées Alimentaires:

En microbiologie des denrées alimentaires, les analyses sont faites sur des matrices alimentaires solides qui nécessitent une homogénéisation par solubilisation dans des solutions liquides. Une fraction de ce liquide (*inoculum*) est ensuite utilisée pour mettre en culture les germes susceptibles d'être présents dans le produit initial.

La technique classique de l'étude microbienne procèdent à la culture des germes préexistants dans l'échantillon sur un milieu nutritif, dans des conditions de *température favorable à l'incubation*. Après un temps d'incubation, les colonies de germes se développe suffisamment importantes pour être identifiées et dénombrées visuellement. (BELAHAUCINE et al, 2018)

Le nombre trouvé est exprimé en nombre de germes par la quantité de produit analysée, c'est le résultat d'une *analyse quantitative*.

Certaines techniques, que l'on qualifie de *qualitative*, permettent de mettre en évidence la présence, ou l'absence, d'un germe défini sans pour autant en donner le nombre. Le résultat est exprimé par la mention « *Présence* » ou « *Absence* » (<http://www.ilm.com>).

Les différentes étapes de l'analyse microbiologique sont présentées sommairement dans la figure suivante :

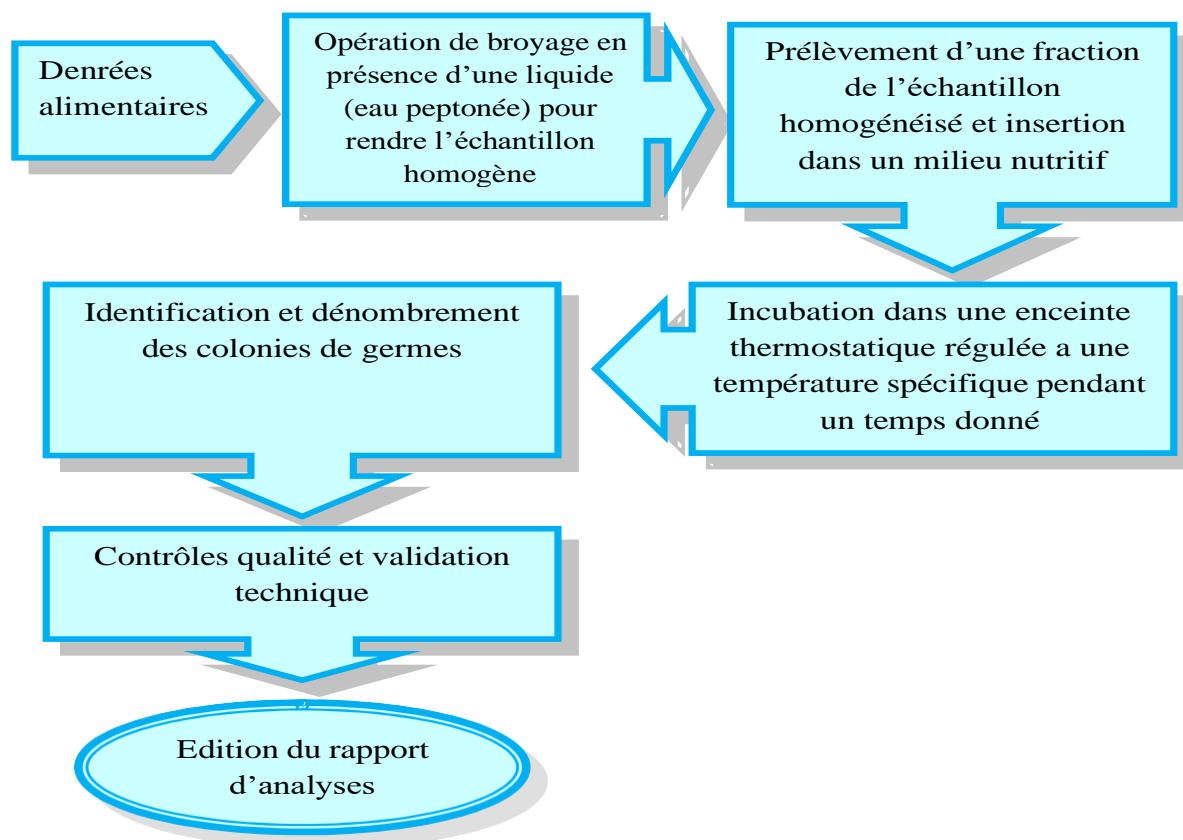


Fig. 2: Les étapes d'analyse microbiologique d'aliment (<http://www.ilm.com>).

## 2- Principes :

Généralement l'analyse d'un aliment n'est pas systématique et elle peut reposer sur des présomptions et de probabilité de présence d'un nombre groupes microbiens le contrôle de la qualité sanitaire est basé sur la numération des germes totaux (flore hétérotrophe aérobie mésophile totale) de l'aliment et sur la recherche de germes indicateurs tels que les coliformes (sauvent associés à des flores pathogènes comme les *Salmonella* ou les *Shigella*), les *Enterocoques*, les phages fécaux actifs sur la flore intestinale, de germes indicateurs d'une contaminations tellurique comme les anaérobies sulfito-réducteurs ou encore et en fonction de la nature du produit sur la recherche de germes ubiquitaires et d'origine humaine ou animale comme les *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Brucella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia* ou encore *Mycobacterium* sont parfois rechercher dans des produits à risques (Aziz et al., 2019). Les résultats

obtenus permettent d'éliminer les produits suspects ou contaminés et surtout d'améliorer la qualité de fabrication pour élimination des points critiques (Cuq, 2007).

## 1. Les Instruments Des Analyses Microbiologiques Des Aliments:

Les exigences permettant de produire des résultats de laboratoire de haut qualité sont les suivantes:

- Un personnel bien formé et expérimenté;
- Un équipement bien maintenu, fonctionnant parfaitement et adapté à chaque type d'examen;
- Des procédures clairement écrites dans une documentation;
- Un échantillon de bonne qualité .

En microbiologie alimentaire, la fréquence des études qualitatives et quantitatives et leur variété font qu'il est nécessaire de disposer d'un nombre élevé de milieux de culture et de matériels divers . Il est indispensable de disposer d'un certain nombre d'équipement et de matériels (WHO, 2014). Tels que:

### 3-1- Systèmes de stérilisation/désinfection et zones stériles :

-**Autoclaves** : horizontaux ou verticaux pour la stérilisation en milieu vapeur des milieux, des "déchets" est indispensable. La « stérilisation » est généralement réalisée à 115 ou 120°C pendant 10 à 30 minutes (Cuq, 2007).

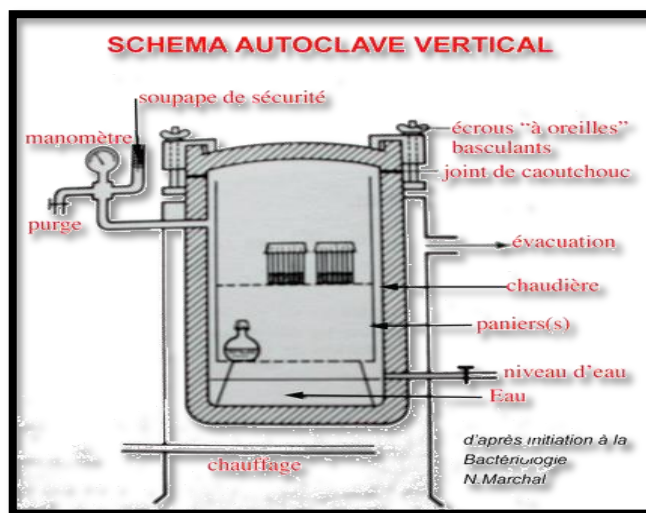


Fig. 3: Autoclave 430X420 ([www.Seconde STL.euro.bioweb.eu.com](http://www.Seconde STL.euro.bioweb.eu.com)).

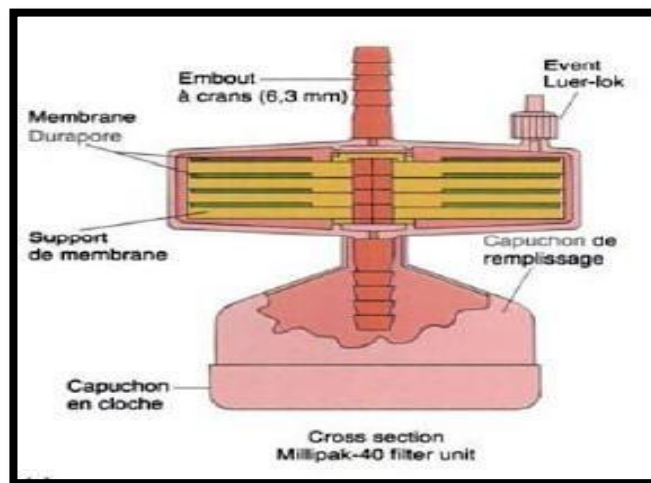
-**Le four Pasteur** : permet la stérilisation à sec du matériel en verre ou en métal et doit pouvoir atteindre une température de 170-180°C (Cuq, 2007).

- **Stérilisation par filtration**: lors de la stérilisation par filtration les bactéries

présentes dans un fluide peuvent être bloquées sur un filtre d'un diamètre de pore 0,2 à 0,22 $\mu$ m. Ces filtres sont connus sous la désignation de filtres bactériens ou ultrafiltres, et il existe dans le commerce un grand nombre de variétés "prêt à l'emploi". La technique est utilisée pour :

les liquides qui ne résistent pas aux températures élevées car ils risquent de changer chimiquement ou d'être inactivés ;

Les composants des milieux de culture qui subissent des réactions indésirables avec d'autres substances pendant la stérilisation à la chaleur (Gaveau, 2016).



**Fig. 4:** Stérilisation par membrane filtre (Prescott & Harley & Klein, 2007).

-Les lampes UV germicides munies d'une minuterie installées dans la pièce principale de manipulation ainsi que dans les hottes à flux laminaires. Leur effet sur un germe donné est fonction de la puissance de la lampe, de la longueur d'onde du rayonnement UV, de la distance et du temps d'irradiation. Elles sont efficaces sur les "zones éclairées". Il est essentiel de se protéger vis-à-vis d'une exposition directe, la muqueuse oculaire étant particulièrement sensible (Tan et al., 2018).

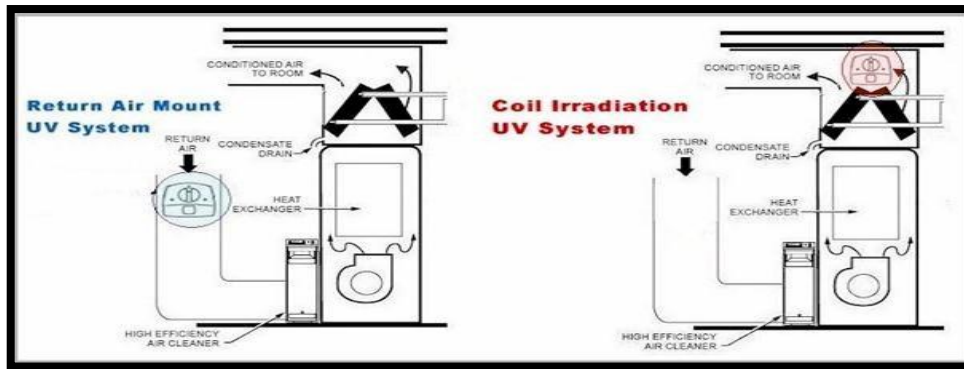


Fig.1 : Les Lampes UV ([www.jaqsource.com](http://www.jaqsource.com)).

- Les récipients contenant par exemple de l'hypochlorite de sodium : pour recueillir les matériels souillés tels que lames états frais, les pipettes, les cônes à usage unique etc.

La récupération des milieux contaminés après lecture peut se faire dans des sacs en polypropylène qui ne seront éliminés qu'après autoclavage (Tan et al., 2018) .

- Les zones de travail : sont utilisées dans la zone de protection de *becs Bunsen* avec déclenchement par bouton "à pied" et/ou des *hottes à flux laminaire* qui selon leur fonctionnement "protègent" avec efficacité soit produit, soit l'opérateur, soit les deux, ces hottes étant classée en trois catégories en fonction de leur fonctionnement. Elles sont utilisées pour la distribution aseptique des milieux et le remplissage de boîtes de pétri. Un flux d'air stérilisé par filtration est dirigé sur la zone de travail soit horizontalement, soit verticalement avec ou non un recyclage. Il ne s'agit pas de zone de sécurité et les hottes de classe I ne peuvent pas être employées seules pour les manipulation des microorganismes; dans ce cas, le travail stérile est réalisé dans le zone de protection d'un bec de gaz, ce dernier présente néanmoins l'inconvénient de perturber le flux d'air dans le système (Tan et al., 2018) .

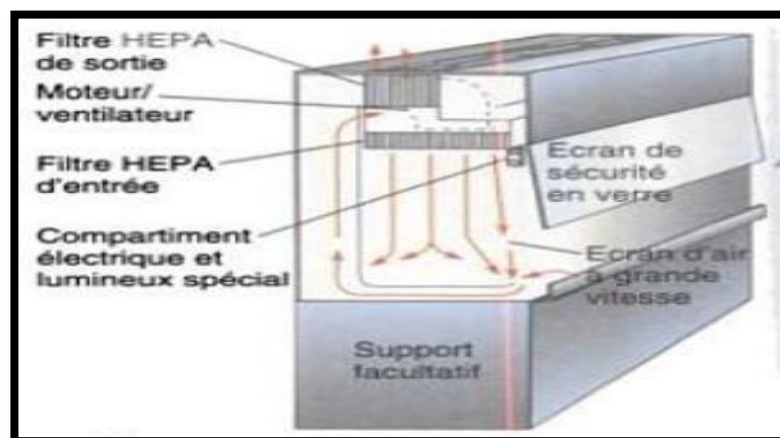


Fig. 6: Hottes à flux laminaire (Prescott & Harley & Klein, 2007).



### 3-2- Matériels D'incubation Et De Préparation Des Milieux:

- **Etuves bactériologiques:** qui doivent pouvoir être réglées avec précision entre 25 et 55°C. trois températures d'avantage sont généralement utilisées en microbiologie alimentaire (Cuq, 2007).

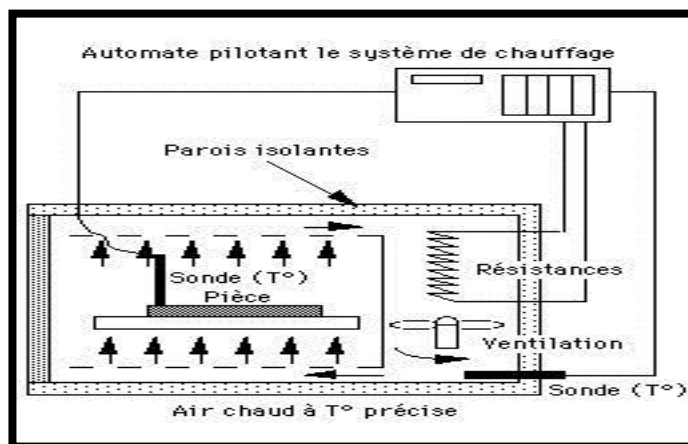


Fig. 7: Etuve 311X253 ([www.cybe.fr](http://www.cybe.fr)).

- **Jarres anaérobies:** Nécessaire de contrôle de l'atmosphère (catalyseur, générateur d'hydrogène et de gaz carbonique, indicateur au bleu de méthylène) sont indispensables à l'étude des germes anaérobies stricts (Cuq, 2007).

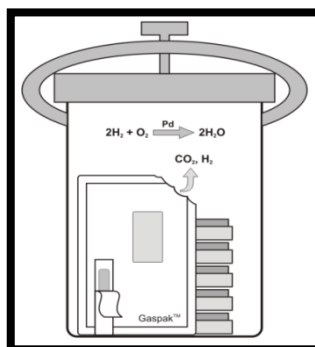


Fig. 8: Jarre anaerobies 633X534 ([www.pages.v.usherbrovle.ca.com](http://www.pages.v.usherbrovle.ca.com)).

- **Bain-marie:** Sont nécessaires pour régénérer les milieu de culture (100°C) et les maintenir en surfusion (45°C à 47°C). Une diminution de l'émission de vapeur d'eau est obtenue par recouvrement de la surface par des petits morceaux de polystyrène (Cuq, 2007).

- **Four à micro-ondes:** Permet de réduire la durée des traitements thermiques des milieux (préparation à chaud, régénération) (Cuq, 2007).

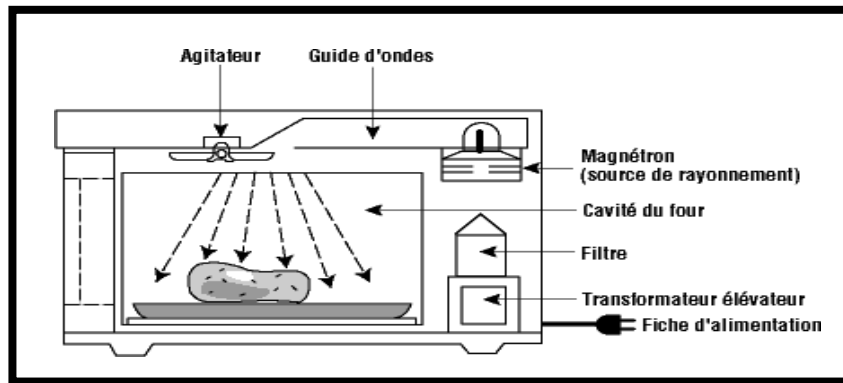


Fig. 9: Four à micro-ondes 225X463 ([www.cchst.ca.com](http://www.cchst.ca.com)).

- **Réfrigérateurs:** Des réfrigérateurs de laboratoire ou professionnels, de différentes capacités, ventilés (température réglable de 0°C à + 15°C), non ventilés (température de +2 à 12°C). Un laboratoire de microbiologie doit disposer d'un réfrigérateur de laboratoire (et/ou chambre froide) par type d'utilisation (cf. recommandations de la norme NF ISO 7218 de 1996):

- Premier réfrigérateur: Il sert à la conservation des milieux de culture préparés ou achetés prêt à l'emploi, des réactifs biologiques à  $3 \pm 2^\circ\text{C}$ .

- deuxième réfrigérateur : Il permet la conservation des bactériennes à  $3 \pm 2^\circ\text{C}$ .

- troisième réfrigérateur : Il assure la conservation des échantillons destinés à l'analyse microbiologique à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  (Daikh et Dafri, 2017).

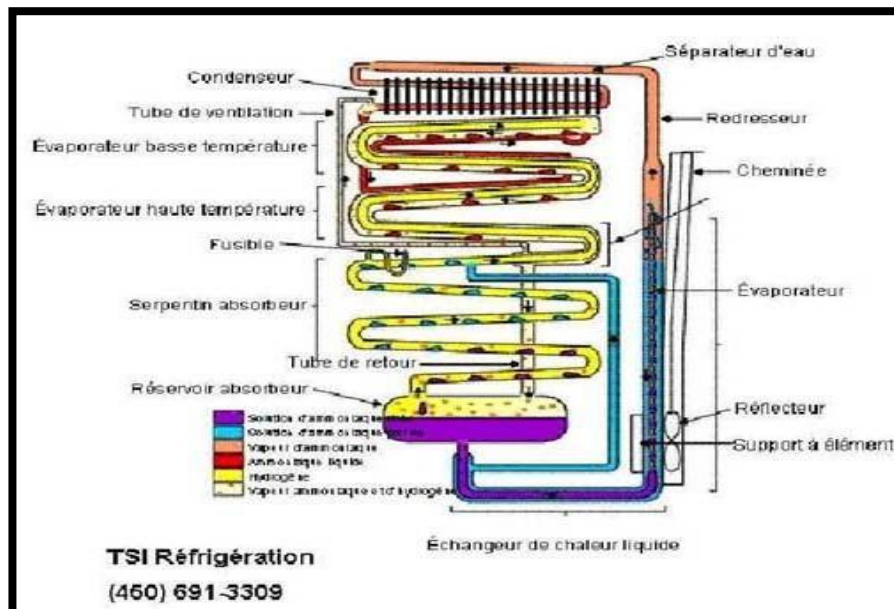


Fig. 10: Réfrigérateur 439X500 ([www.tsirefrigeration.com](http://www.tsirefrigeration.com)).

- **Glacières:** Des glacières conventionnelles, non électriques, de différents volumes assurent la conservation à une température inférieure de 32°C par rapport à la température ambiante.

Un glacière est employée lorsque des échantillons doivent être transportés de leur lieu de prélèvement vers le laboratoire d'analyses microbiologiques.

- **Congélateurs:** Verticaux ou horizontaux, ventilés ou non de -18 à -25°C, de -25 à -35°C ou -40°C, sont proposés aux professionnels en fonction des besoins.

La conservation au froid, à une température inférieure à -18°C ou égale à  $-24 \pm 2^\circ\text{C}$  est utilisé pour :

- Certains milieux de cultures et réactifs.

- Des souches bactériennes.

- Des échantillon pour analyse (**Daikh et Dafri, 2017**).

- **Balances:** Balances portables, balances de laboratoires, balances industrielles, micro-lances..., conformes aux bonnes pratiques de laboratoire. Elles doivent répondre aux besoins du laboratoire, en portée (maximale entre 60g à 200g par exemple) et en précision (0,01g et 0,0001g en général).

Elles servent principalement :

- Aux pesés de substances chimique intervenant dans la composition de milieux de culture non commercialisés.

- Aux pesés de poudres des milieux de culture vendu sous forme déshydratée.

- Aux pesés de colorant et autre substance servent à la préparation de colorants de microbiologie (bleu de méthylène, bleu de toluidine, fuchsine de Ziehl...).

- A la pesés d'échantillon d'aliments ou d'autres produits à analyser (Khenfouf et Maameri, 2020).

- **pH-mètres:** Différent types de pH-mètres existant: pH-mètre de laboratoire, pH-mètre portable, pH-mètre stylo.

Ces appareils permettant de mesure la différence de potentiel existant entre deux électrodes plongeant dans un liquide, à une température définie. En microbiologie il servent surtout à contrôler:

- Le pH des milieux de culture, acide (3 à 6) pour les champignons et entre 6 et 7,5; pour le bactérie.

- Le pH de l'échantillon à analyser ou de la suspension mère préparée à partir de l'échantillon (**Daikh et Dafri, 2017**).

- **Réceptacle en verre et en matériaux plastique:** Les réceptacles utilisés par les microbiologistes sont généralement en verre borosilicaté (verre Pyrex, verre Duran..), alors que ceux utilisés par les chimistes sont en verre sodocalcique. Les réceptacles en matériaux plastiques existent en plusieurs types au choix, parmi lesquels figure le polypropylène (pp) autoclavable. Tous les réceptacles sont conformes aux ISO/DIN en vigueur; ils sont présentés dans les tableaux 1, 2 et 3 (**Daikh et Dafri, 2017**).

**Tableau 1:** Tubes de culture utiles pour le travail en microbiologie (**Daikh et Dafri, 2017**).

Réceptacle utiles	Description	Utilité
Tubes de culture en verre borosilicaté	.Fond plat ou rond, de différentes dimensions (dont Ø 16 ×160mm), col à vis avec capsule en aluminium ou bouchon polypropylène (ou plastique phénolique), avec joints (PTFE*...) autoclavable. .Fond rond (Ø18×80...), sans capsule, à boucher au coton cardé ou avec des bouchons en ouate de cellulose	Cultures bactériennes en milieux liquides (bouillons) ou solides (géloses)
Tubes à hémolyse en verre borosilicaté	Le plus courant : tube Ø12×75mm, à boucher (bouchon en polyéthylène)	.Tests biochimiques : catalase, oxydase...
Tubes en polystyrène ou polypropylène	Bouchon entrant, à usage unique	.Suspensions bactériennes en eau distillée stérile...
Tube de Roux en verre borosilicaté	Tube Ø22×220mm, présentant un étranglement dans sa partie basale	Cultures de champignons
Tube en verre sodocalcique «cloche de Durham»	Tube à fond rond, Ø6,5 à 7mm et 35mm de longueur.	Sert à recueillir les gaz de fermentation des glucides par les bactéries

\*PTFE : joints en Téflon<sup>®</sup>, recommandés pour les autoclavages répétés.

**Tableau 2 :** Récipients spécifiques utiles pour le travail en microbiologie (Daikh et Dafri, 2017).

Récipients spécifiques	Description	Utilité
Boîtes de Pétri en polystyrène	-Rondes, avec ergots de ventilation, aseptiques ou stériles rayons $\gamma$ , Ø standard 90mm, à usage unique -Existent en d'autres diamètres, carrée, compartimentées ou non...	Cultures bactériennes sur milieux gélosés
	Rondes, Ø 55 mm, aseptiques ou stériles rayons $\gamma$ pour les membranes filtrantes	Cultures sur membranes filtrantes en microbiologie des eaux
	De contact, rondes, a fond bombé Ø 55mm, avec ergots de ventilations	Contrôles microbiologiques d'hygiène des surfaces
Pipettes Pasteur en verre (sodocalcique ...)	Cotonnées, boutonnées (pointe autocassable), stériles, à usage unique	Ensemencement de milieux liquides en tubes, de galeries API ...
	En pointes ouvertes, non cotonnées, non stérile	Ensemencement des boîtes de pétri à la pipette pasteur boutonnée stérile

**Tableau 3:** Récipients non spécifiques utiles pour le travail en microbiologie: (Delarras, 2007).

Récipient non spécifiques	Description	Utilité
Pipettes en polystyrène cristal à usage unique stériles ou pipettes graduées en verre (sodocalcique...)	-De différentes capacités (les plus commercialisée stériles en emballage unitaire -De différentes capacités, à stériliser à l'autoclave en container inox	Technique générale des dilutions
Divers	Béchers gradués, en verre borosilicaté ou en polypropylène PP, autoclavable de différentes capacités : 250 ml, 500 ml, 1000ml...	Récipients utilisés lors de la préparation de milieux de culture
	Eprouvettes graduées, en verre borosilicaté ou en polypropylène PP, autoclavable: 100 ml, 500ml, 1000ml	
	Fioles jaugées en verre borosilicaté: 100ml, 250ml ...	

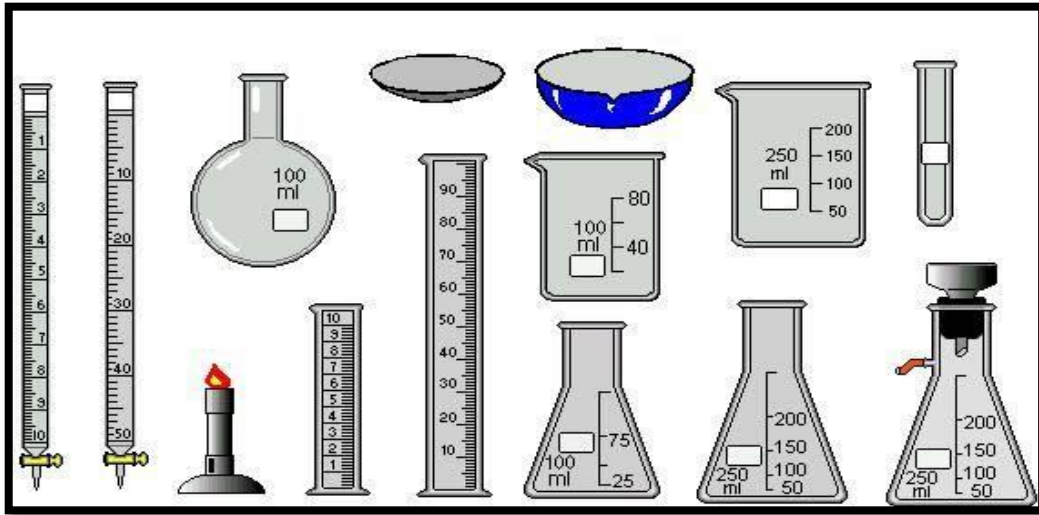


Fig. 11: Récipients 305x564.

### 3-3-Matériels Pour La Préparation Des Echantillon:

Les échantillons sont amenés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits fini ou dans des flacon ou récipients stériles s'il s'agit de produit en vrac ou de "prélèvement". Il faut parfois disposer de matériels permettant le prélèvement d'aliments dans les emballages solide (poissons, ouvre-boîtes) ou encore de matériels indispensables au prélèvement d'aliments solide (cautérisateur, pipettes harpons, etc.) (Tan et al., 2018) .

(Tan et al., 2018)

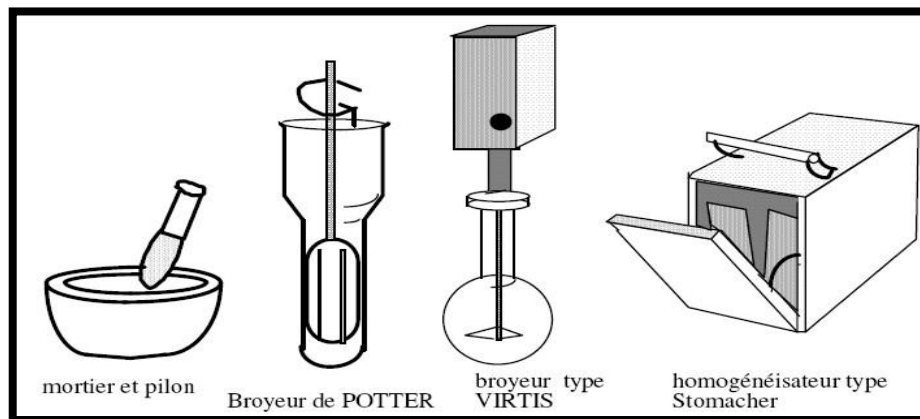
La première traitement auquel sont soumis la plupart des produits consiste, après prélèvement d'une partie aliquote, en *homogénéisation*. Celle-ci est réalisé au moyen:

- **Broyeurs-homogénéisateurs:** En microbiologie alimentaire, les aliment autres liquides, à analyser, doivent être broyés homogénéisés en vue de préparer la suspension mère de l'aliment et ses dilution décimales, conformément à la norme NF EN ISO 6887-1 (1999). Deux types d'appareils permettent d'effectuer la préparation des échantillon d'aliments en microbiologie:
  - Des appareils broient des aliment solides, déposés avec le diluant dans de sacs stériles irradiés, dans une chambre fermée, grâce à une système de pales de broyage en inox (Daikh et Dafri, 2017).
  - D'autre appareilles appelé « broyeurs à couteaux » broient les aliment solides, déposés avec le diluant dans un bol de broyage en verre muni de couteaux.
- **Agitateurs:** Les agitateurs mécaniques, type Vortex servent notamment en microbiologie des eaux et des aliments à homogénéiser des milieux de culture en tubes. Ces appareils sont une vitesse fixe (200 tours/min) ou sont réglables en continu jusqu'à 2200 tour/min (parfois plus); ils

fonctionnent en continu ou par intermittence par pression sur la tête du tube (**Daikh et Dafri, 2017**).

- **Centrifugeuse**: Atteignant 3 à 4000g permet, en peu de temps, de décante les microorganismes présent dans les liquides. Des tubes bouchés sont indispensables pour éviter la contamination aérienne.

- **Vortex**: Permet d'homogénéiser les suspensions bactériennes présents dans les tubes, en particulier au moment de dilution ou des prélèvements (**Tan et al., 2018**).



**Fig. 12:** Divers systèmes de broyage/homogénéisation (**Cuq, 2007**).

### 3-4- Microscopes Optiques:

Les microscopes optiques binoculaires sont indispensables au microbiologiste car ils permettent en routine l'observation à l'objectif fort grossissement et à l'immersion (**Daikh et Dafri, 2017**).

### 3-5- Compteurs De Colonies:

Des compteurs de colonies plus ou moins perfectionnés servent à dénombrer les colonies microbiennes (bactéries, champignons) développées dans et/ou sur des milieux gélosés spécifiques en boîtes de pétri :

- Le compteur de colonies type **Stylo** : À tenir dans la main, le plus simple, fonctionne sur batterie.
- Le compteur de colonies type **électroniques** : Le plus courant, est un appareil à poser sur une paillasse.

- Le compteur de colonies type **automatique** : Pourvu d'une caméra numérique haute résolution, est connectable par interface à un PC avec logiciel d'exploitation (Daikh et Dafri, 2017).

## 4-Les Etapes Des Analyses Microbiologique Alimentaire :

### 4-1- Echantillonnage Et Prélèvement :

Il s'agit d'une étape fondamentale souvent délicate, les ouvrages consacrés à l'échantillonnage sont nombreux et des règles précises par produit ou milieu ont été édictées par l'AFNOR et la DGCCRE; si les échantillons ne sont pas correctement prélevés et manipulés ou ne sont pas représentatifs d'un lot ou d'une production, les résultats d'analyse n'auront aucune signification. Un échantillonnage représentatif est essentiel quand l'analyse a pour but de détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines qui peuvent être distribués de façon hétérogènes dans l'aliment ou quand la commercialisation d'un produit dépend de la qualité microbiologique en relation avec normes imposées par la législation (Cuq, 2007).

Il faut choisir des échantillons on définir le lieu et les conditions des prélèvements, il faut ensuite réaliser ces prélèvements et les transmettre dans bonnes conditions au laboratoire d'analyse.

#### **définition :**

**Lot** : Partie d'une même livraison ou d'un même fabrication présentant les mêmes caractéristiques.

**Élément** : Partie indivisible du lot.

**Prélèvement** : Quantité aliquote ou élément indivisible prélevé au sein d'un lot (parfois appelé échantillon élémentaire).

**Echantillon global** : Réunion de plusieurs prélèvements issus d'un même lot.

**Echantillon réduit** : Fraction représentative de l'échantillon global.

**Echantillon pour** : Fraction de l'échantillon globale ou réduit, destinée au laboratoire (Guiraud, 1998).

#### **Principaux schémas utilisés :**

Pour de nombreux produits, des techniques d'échantillonnage ont été décrites et certaines font l'objet de normes françaises (NF), européennes ou internationales. Ces techniques sont le plus souvent adaptées à des analyses chimiques et ne peuvent pas toujours être appliquées directement aux analyses microbiologiques; elles peuvent cependant servir de base de travail. Pour plus de précisions, on se reportera aux textes correspondants.



En microbiologie, les schémas statistiques classiques sont difficilement utilisables . l'échantillonnage idéal est un échantillonnage à 100% ce qui est impossible lorsque l'on a affaire à des éléments indivisibles que l'analyse conduit à détruire (conserve). Il peut être applicable lorsque l'on a affaire à des produits en vrac on une partie aliquote peut être prélevée sans nuire au reste du lot (**Guiraud, 1998**).

Un premier problème à résoudre est le contrôle d'une donnée quantitative dont la présence est constante et normale. Il s'agit de contrôler, souvent en continu, le niveau d'une flore ou d'un constituant chimique dans la matière première, le produit fini ou à des stades délicats de la fabrication. Il faut, soit maintenir ces niveaux à l'intérieur d'une fourchette, soit déterminer une valeur moyenne pour le caractère étudié. Du point de statistique, un échantillonnage satisfaisant est réalisé en prélevant un nombre d'échantillons égal à la racine carrée du nombre de divisions élémentaires du produit à analyser, mais ce nombre devient rapidement excessif. Il est recommandé de prélever 10 échantillons élémentaires, quel que soit le nombre d'éléments dans chaque lot, le nombre minimum étant de 5 (**Guiraud, 1998**).

Le deuxième problème à résoudre, très différent du premier, est la mise en évidence d'un défaut grave et inhabituel dans certains éléments d'un lot par exemple une contamination bactériologique exceptionnelle. Dans ce cas ,la proportion minimum de pièces défectueuses décelables dépend de la dimension de l'échantillon, c'est à dire du nombre de pièces prélevées et analysées. La détermination de la proportion de pièces contaminées dépend du nombre absolu de pièces prélevées pour composer l'échantillon et non du rapport entre le nombre de pièces échantillonnées et le nombre de pièces du lot. Nous donnons ci-dessous quelques exemples du pourcentage de contamination décelables en fonction du nombre de pièces analysées dans un lot (d'après norme FIL2/1958) (**Guiraud, 1998**).

Nombre de pièces échantillonnées et pourcentages de contamination décelable :

10 → 37

20 → 21

30 → 16

50 → 10

4 → 100

Le nombre d'échantillons à prélever peut être déterminé mathématiquement de façon précise en fonction du degré de sûreté voulu en appliquant la formule suivante:

$n = \ln(1-p) / \ln(1-d)$ ; (**n**= nombre d'éléments à échantillonner; **p**= probabilité de déceler le défaut ou la présence d'un micro-organisme dans les éléments prélevés; **d**= pourcentage de défaut admis pour le lot entier ).

La commission internationale des normes microbiologiques relatives aux denrées alimentaires (ICMSF) a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires. L'interprétation des résultats dépend de la méthode utilisée : plan à 2 ou 3 classes (voir plus bas). Dans ces plans, on définit des valeurs  $n$  et  $c$  :  $n$  est le nombre d'échantillons examinés,  $c$  est le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil ou dans une fourchette de valeur. La rigueur du plan dépend des valeurs de  $n$  et de  $c$  : plus grand est  $n$  pour une valeur donnée de  $c$ , meilleure sera la qualité des lots acceptés. Le plan est choisi en fonction de l'estimation du risque pour la santé et du mode d'utilisation de l'aliment. Le plan à classes est utilisé pour les germes très pathogènes, celui à 3 classes pour les autres germes. La méthode d'échantillonnage est indissociable des résultats et de l'interprétation de l'analyse (Guiraud, 1998).

#### 4-1- Fréquence des Prélèvements :

Elle dépend essentiellement du niveau de production et des risques de contamination ou de défauts de fabrication des produits. La fréquence des analyses de routine doit être régulière : elle sera d'autant plus grande que la production sera importante. Il est intéressant, en outre, d'effectuer des analyses chaque fois qu'une variation survient au niveau de la fabrication (lot différent de matière première, mise en service, modification ou réparation d'un appareil, etc.) (Guiraud, 1998).

#### 4-2-Traitement De Echantillon :

L'échantillon fourni au laboratoire consiste soit en un produit liquide, solide ou hétérogène prélevé dans un récipient stérile soit en un produit emballé tel qu'il est commercialisé.

Pratiquement toutes les analyses s'effectuent à partir d'une suspension liquide parfaitement standardisée par rapport au produit de départ, c'est-à-dire de concentration connue. La préparation de l'échantillon nécessitera l'ouverture aseptique de récipients fermés (produit emballés, bouteilles conserves) et l'homogénéisation ou la fluidisation des produits non liquides. Cette opération consiste parfois en un broyage couplé à une première dilution (Guiraud, 1998).

##### 4-2-1- Conditions De Conservation Et De Transfert De L'échantillon Au

##### laboratoire :

- **Étiquetage** : Les échantillons doivent être soigneusement étiquetés. L'étiquette doit comporter tous les éléments nécessaires à la bonne exploitation des résultats de l'analyse : Numéro d'ordre, date, heure, lieu précis, modalités particulières du prélèvement. Indications utiles telles que

température de la salle, température et pH d'un aliment voisin nom de la personne ayant effectué le prélèvement (**Guiraud, 1998**).

- **Stabilité** : Si l'échantillon doit être transporté il faut réduire au maximum le délai avant l'analyse. Il est souvent nécessaire de réfrigère (mais non congeler) le produit ou cours de sont transport certain germe fragile peuvent disparaître ou cour de cette réfrigère (**Cuq, 2007**).

- **Milieu de transport** : Dans certains cas, il est possible ou nécessaire d'utilise pendant le transport un milieu limitant la mortalité de germe particulièrement fragiles : Il s'agit de milieu faiblement nutritifs qui sont favorables au métabolisme des germes mais sans permettre une multiplication qui affecterait leur nombre ou moins pendant un délai raisonnable (**Guiraud, 1998**).

#### 4-2-2- Préparation De L'échantillon :

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution :

Pour les **produits liquides** (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour les **produits solides** diverses techniques de "broyage" sont utilisables :

- *Broyage manuel* au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier) .

- *Broyage mécanique* :

\*avec un broyeur électrique à couteaux de type VIRTIS.

\*avec un broyeur du type STOMACHER (**Fig. 12**) (**Cuq, 2007**).

#### 4-3- Diluants :

Elles sont nécessaires dans le cas de produits contenant un nombre élevé de micro-organismes. Elles sont généralement réalisées à l'aide d'eau physiologique, de Ringer au 1/4 ou de milieu tryptone-sel. La norme V 08-010 (1982)/ISO 6887 (Microbiologie alimentaire Directives générales) concerne les dilutions (milieu tryptone-sel).

La suppression des dilutions est possible pour les produits liquides. L'ensemencement peut être réalisé directement par un fil à boucle calibrée. Cette technique donne des résultats voisins de ceux obtenus par méthodes classiques à condition de prélèvement. Notons qu'il est possible des dilueurs automatiques (**Guiraud, 1998**).

**Tableau 4:** Les diluants utilisés pour certains produits alimentaires (Abekhti, 2011):

Produits	Diluants
produit riche en protéine et en minéraux	Ringer ou Eau physiologique
produits gras (beurre, margine,...)	Déliant contenant du citrate de sodium 2%
les fromages frais, crèmes fraîches.	Solution de à 2% (pH 7,4)
produit acides au fort pouvoir tampon	Eau peptonée tamponnée
produits très salés (>5 %)	Diluant contenant 5% de Na Cl
produits très sucrés	Diluant à 40% de sucre.

#### 4-4 Revivification (liquide, solide) :

Les micro-organismes sont souvent « *endommagés* » mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid, etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillessement.

La nécessité de faciliter le "rétablissement" des cellules ayant subi des altérations sublétales, s'impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d'inhibiteurs. En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu'il n'y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.

Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d'incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps déterminé (temps de latence) (Abekhti, 2011).

#### 4-5-Techniques D'Analyse :

L'identification d'un microorganisme ne peut avoir lieu que lorsqu'il a été isolé à l'état pur. Les techniques utilisées pour l'identification sont nombreuses et varient en fonction de la nature du germe étudié: Levures, moisissures et bactéries, ou même en fonction du groupe bactérien. L'identification peut se réaliser à partir des caractères morphologiques, culturels,

biochimiques, physiologiques, sexuels, immunologiques, lysotypiques génétiques et pathogénicité (Guiraud, 1998).

#### 4-5-1- Analyse Microscopique :

##### Etude microscopique générale :

Cet examen peut s'effectuer à l'état frais ou sur un frottis fixe ou sur les deux. Le prélèvement s'effectue directement sur l'aliment à l'ose ou à la pipette Pasteur. Les frottis sont colorés au bleu de méthylène ou de préférence par la coloration de **Gram**, l'examen microscopique peut être cependant utile dans les cas suivants :

- Mise en évidence d'une contamination dans une flore de fabrication.
- Estimation de la flore totale (viable et morte) ou de la charge microbienne initiale d'un aliment ayant subi un traitement antimicrobien.
- Numération directe des levures par utilisation de l'hématimètre.

Dans le cas de fermentations multi microbiennes, étude rapide de la composition relative et de l'évolution de la flore au cours de fabrications (Guiraud, 1998).

##### Etudes particulières:

- **Recherche du bacille tuberculeux** : En recherche les germes acido-alcoolo-résistants parmi lesquels peut se trouver *Mycobacterium tuberculosis*.
- **Etude des cellules animales** : Il s'agit d'une étude biologique complétant l'analyse microbiologique. Elle s'effectue dans le cas du lait cru et consiste en la détermination de la formule leucocytaire.
- **Recherche des parasites** : Cette recherche s'effectue essentiellement par observation directe des produits. Elle permet la mise en évidence de: *Cestodes*, *trématodes*, *nématodes*, *protozoaires*, cette recherche est surtout réalisée dans la viande et les produits carnes (Guiraud, 1998).

#### 4-5-2- Analyse Quantitative:

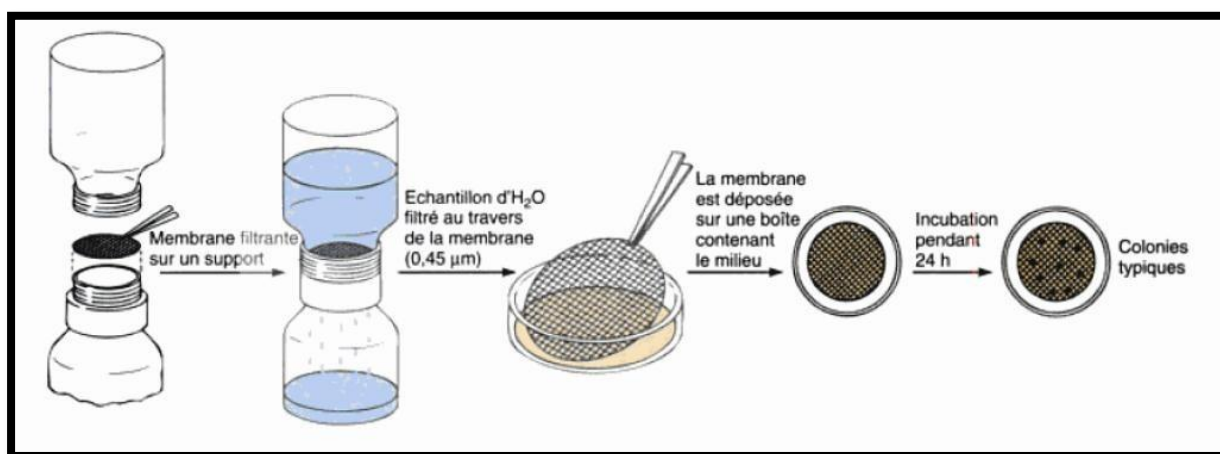
La revivification peut être réalisée dès la première étape de l'analyse au cours de laquelle le produit est additionné de diluant. Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d'incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps voisin du temps de latence du germe « normal » après cette phase préalable de revivification, la numération est réalisable soit en milieu liquide soit en milieu solide :

-**numération en milieu liquide**: La technique de numération en milieu liquide est souvent appelée en microbiologie alimentaire « technique de numération en tubes multiples » (TNTM) avec détermination du nombre de germes le plus probable (NPP), elle permet d'étudier un

caractère difficilement mis en évidence sur milieu solide (production de gaz au moyen d'une cloche...). Un dénombrement sur milieu liquide est effectué sur milieu peu sélectif favorable à la multiplication des micro-organismes en mauvais état physiologique.

**-numération par étalement ou inclusion en milieu gélosé (milieu solide)** : Les méthodes de numération sur milieu solide sont très utilisées pour le dénombrement de la flore dite « totale » (flore aérobie mésophile) ainsi que pour le dénombrement de flore particulières ou indicatrices. Il existe des techniques particulières faisant intervenir un appareillage ou des supports de culture adaptés : Dénombrement « spiral » (norme V 08-100), dénombrement sur Pétrifilm 3M (norme ISO 4833), etc.

**-numération par filtration sur membrane** : Cette méthode est rapide mais elle n'est utilisable qu'avec des produits liquides de fluidité satisfaisante et ne contenant pas trop d'impuretés. La numération sur membrane est appliquée dans de nombreux cas : Flore « totale », flores indicatrices (Guiraud, 1998).



**Fig.41:** Précédé de numération par filtre sur membrane (Prescott & Harley & Klein, 2007).

**-numérations microscopiques** : Utilisation de lame de Breeds et la lame de comptage (Thoma, Mallasse) (Branger & Richer & Roustel, 2007). Numération à l'hématimètre sur un frottis (Guiraud, 1998).

**-Autres techniques** : Le dosage de l'ATP par le système luciférase/luciférine (bioluminescence). La présence de micro-organismes modifiant la résistivité d'un milieu; on peut citer comme exemple l'appareil Coulter Counter (Centronics) (Guiraud, 1998).

▪ **Flores étudiées:**

▪ **flore « totale » ou « globale »: flore aérobie mésophile totale (FAMT):** L'étude quantitative de la flore « totale » ou « globale » correspond au dénombrement de la flore mésophile aérobie revivifiable car l'incubation s'effectue à une température de 30°C pendant 72 heures. Parfois une autre numération est effectuée à 37°C, durant 24 à 48 heures.

▪ **Groupes physiologiques particuliers, flores «indicatrices»:** Ces études quantitatives présentent un grand intérêt au niveau industriel. Elle peuvent permettre de mettre en évidence une mauvaise qualité générale, le lieu ou le stade où une contamination s'est produite, l'éventualité d'un mauvais traitement thermique, un danger potentiel au niveau de la fabrication ou de la conservation, etc.

Elle permettent également de suivre l'évolution d'une flore favorable :

**Flores à propriétés particuliers :** Flore thermophile ou psychrophile, flore fongique totale, flore putride, flore thermorésistante, flore anaérobie , flore indologène.

**Flores indicatrices :** Les études les plus fréquentes portent sur les flores de contamination fécale : *Entérobactéries*, *Coliformes*, *coliformes thermo tolérants* et *Escherichia coli*, *Streptocoques fécaux (enterocoques)*, *Clostridium sulfito-réducteurs*, parfois *bactériophages fécaux*, *Staphylocoques*, levures et moisissures (concerne le dénombrement des levure et moisissures en milieu solide « gélose glucosée au chloramphénicol et OGA ») (**Guiraud, 1998**).

### 4-5-3- Analyses Qualitative Et Recherche Des Germes Pathogènes :

Plusieurs types d'études qualitatives peuvent être réalisées au cours de l'analyse microbiologie: Il peut s'agir soit de la rechercher sélective des germes pathogènes, soit de l'isolement et de l'identification des composantes de la flore non pathogène (flore « globale » ou FAMT, flore indicatrice ou particulières, espèces intéressantes au plan industriel) (**Guiraud, 1998**).

▪ **Identification des flore « non pathogènes » :**

L'isolement et l'identification peuvent s'effectuer, soit à partir des colonies obtenues sur les milieux de dénombrement (étalement sur gélose ou filtration sur membrane ), soit par la méthode des stries d'épuisement sur milieu gélose à partir d'un milieu liquide. Ces isolement réalisés sur un milieu non sélectif ne permettent de mettre en évidence que les germes présents en grande quantité. Ceci n'est intéressant que lorsque la flore que l'on désire étudier est abondante. Il est impossible d'isoler de la sorte un germe présent dans une proportion inférieure à  $10^{-2}$  et rarement  $10^{-3}$ . L'emploi de milieu sélectifs ou spécifiques permet de résoudre ce problème. Si l'on désire étudier la fréquence relatives des différents composant, la méthode par stries est à proscrire.

Pour effectuer des prélèvements avec détermination de fréquence sur milieu ordinaire ou spécifique, on pourra prélever, soit toutes les colonies lorsqu'il y en a moins de 20, soit toutes les colonies présentant une morphologie différente (en effectuant un contrôle microscopique et en relevant la fréquence des types prélevés), soit un échantillon statistiquement représentatif (par exemple en prélevant toutes les colonies dans un secteur limité par deux rayons dans la boîte). Dans le cas des milieux différentiels, l'étude statistique pourra être réalisée pour tous les types de colonies mises en évidence par la méthode de numération de milieu gélose (Guiraud, 1998).

#### Mise en évidence et identification des bactéries pathogènes :

Les techniques d'enrichissement et de concentration sont souvent nécessaires pour la mise en évidence des germes pathogènes car ils peuvent se trouver en très faibles quantités ou être « stressés » alors qu'il faut absolument les mettre en évidence :

**Recherche des germes :** Elle a lieu selon les circonstances (nature du produit, du germe, de l'environnement) directement ou après enrichissement. Elle est basée sur l'emploi de milieux sélectifs solides avec souvent confirmation par l'identification de la souche.

- *Entérobactéries pathogènes* : *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*.

- *Vibrions pathogènes* : *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Campylobacter*.

- *Staphylocoques entérotoxiques* : *S. aureus*.

- *Germes sporulés pathogènes* : *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *C. botulinum*.

- *Listeria monocytogenes*.

- *autres bactéries et organismes pathogènes*: *Streptocoques* de mammites, *Mycobacterium*..., etc

(Guiraud, 1998).

#### 4-5-4- Analyses Complémentaires :

L'analyse microbiologique peut être complétée par des analyses chimiques ou physico-chimiques : Caractérisation de métabolites microbiens et des produits de dégradation de l'aliment (ces produits pouvant être toxiques), recherche et dosage de toxines (et mycotoxines), etc. Certains produits peuvent être caractérisés par des méthodes immunologiques (tests ELISA). Par ailleurs, on peut réaliser des tests de pasteurisation ou de stérilisation et des tests de stabilité. Rappelons que l'on effectue fréquemment des estimations de la flore microbienne (Guiraud, 1998).



***Chapitre III***  
***les analyses***  
***microbiologique***  
***médicale***

Cette partie du mémoire traite l'ensemble des analyses microbiologiques réalisées dans le domaine médical. Ces analyses revêtent d'une importance capitale vue la nécessité d'un bon diagnostic qui assiste la consultation médicale et la prescription du traitement des maladies d'origine microbienne

Le rôle principal du **microbiologiste dans le domaine médicale** consiste à isoler et identifier rapidement les micro-organismes dans des échantillons biologiques.

Les analyses biologiques sont réalisées sur des échantillons prélevés chez des patients, dans conditions strictes, puisque le constituant à doser ou à rechercher ne doit pas subir de modification qualitative ou quantitative durant la période située entre le recueil et l'analyse, période considérée comme la première phase de l'analyse (**Prescott, 2016**).

### **1- Définition :**

La microbiologie médicale est l'étude des microorganismes pathogènes pour l'homme. Elle a pour principal objectif le diagnostic des infections, mais embrasse également l'épidémiologie, la pathogenèse, le traitement et la prévention des maladies infectieuses (**Shears & Hart, 1997**).

### **2- Principe D'analyse Microbiologique Médicale:**

Les principaux objectifs des analyses microbiologiques sont d'isoler et d'identifier les microorganismes pathogènes et de mesurer leur sensibilité aux antibiotiques. Les analyses sont définies par le Guide de Bonne Exécution des Analyses comme un ensemble d'étapes successives, allant du prélèvement de l'échantillon biologique jusqu'à la remise des résultats.

### **3- Les Matériels Des Analyses Microbiologiques Médicales :**

Tout laboratoire réalisant des analyses de biologie médicale doit être équipé au moins du matériel cité à l'article 9 du décret n°76-1004 du 4 novembre 1976, modifié par le décret n° 95-1321 du 27 décembre 1995.

- a) Un **microscope** pourvu des accessoires indispensables à l'exécution des actes pratiqués par le laboratoire;
- b) Un **centrifugeur**, avec ses accessoires, adapté aux examens pratiqués et permettant d'obtenir au fond des tubes une accélération comprise entre 500 et 2500 (g).

c) Un **spectrophotomètre** disposant d'un gamme spectrale compris entre 3400 et 700 nanomètres; cet appareil doit permettre de sélectionner une longueur d'onde avec une incertitude inférieure à 2 nanomètre; la bande passante à mi-hauteur doit être inférieure ou égale à 10 nanomètre; l'appareil doit permettre d'apprécier des absorbance compris entre 0 et 2 et des variations d'absorbance de 0,002 pendant une période au moins égale à trois minutes; l'appareil doit comporter un dispositif de régulation thermique des cuves.

d) Une **balance** permettant d'apprécier le milligramme.

e) Une **étuve** à température réglable jusqu'à 120°C.

f) Un **bain-marie** (bain d'eau) à température réglable jusqu'à 60°C.

g) Un **réfrigérateur** à +4°C.

h) Un **congélateur** permettant d'obtenir une température égale ou inférieure à -18°C.

i) Le petit matériel permettant de mesurer avec précision les volumes et la verrerie courante **(Guy & Jean, 2006)**.

Les laboratoires doivent, en outre être équipés du matériel nécessaire à la bonne exécution des différentes catégories d'analyses de laboratoire conformément aux règles de guide. Ce matériel doit être complété, dans certains cas par un équipement spécifique comme indiqué ci-dessous pour les analyses microbiologiques et parasitologie.

- Un dispositif permettant la centrifugation en nacelles étanches.
- Deux étuves à températures réglables, y compris celle mentionnée dans le décret précité.
- Un dispositif permettant de produire et d'entretenir une atmosphère appauvrie en oxygène et/ou enrichie en dioxyde de carbone dans une enceinte appropriée.
- Pour les laboratoires pratiquant l'identification et le cas échéant, les antibiogrammes des agents biologiques pathogènes visés dans l'arrêté du 18 juillet 1994 modifié, le matériel et notamment les hottes de confinement doivent être adaptés.
- Un congélateur à 80°C et un microscope inversé pour les laboratoires pratiquant les cultures virales.
- Un micromètre oculaire étalonné pour la parasitologie.
- Pour les laboratoires d'analyses de biologie médicale et les catégories de personnes auxquelles est réservée l'exécution de certains actes de bactériologie et de virologie, le matériel prévu par la réglementation **(Guy & Jean, 2006)**.

**Tableau 4** : Table de préconisation du matériel de prélèvements (Marsot & Duverneuil, 2009) :

L'utilisations	Matériels
<p>.Bactériologie standard Aérobie                      Bactériologie standard Anaérobie                      Bactériologie standard pédiatrie (aéroanaérobie)                      .Bactériologie et recherche de Mycobactéries.                      .Mycologie recherche de Levures.</p>	 <p><b>flacons</b></p>
<p>.Recherche de virus : Prélèvements Cutanémuqueux                      .Recherche Bactériologique : peau , muqueuses ,                      prélèvements génitaux</p>	 <p><b>Ecouvillon VIROCULT spécifique</b></p>
<p>. Recherche de virus : Prélèvement dans les Selles</p>	 <p><b>Pot stérile</b></p>
<p>.Recherche Parasitologiques ou Mycologiques dans les selles</p>	 <p><b>Pot à selles</b></p>
<p>.Recherche Mycobactériologique : BK                      .Recherche Bactériologique                      .Recherche de virus                      .Recherche mycologique</p>	 <p><b>Flacon stérile de Recueil.</b>  <b>Tube stérile de 5ml avec acide borique (conservater )</b></p>

4-Les Etapes Des Analyses Microbiologique De Médicale:

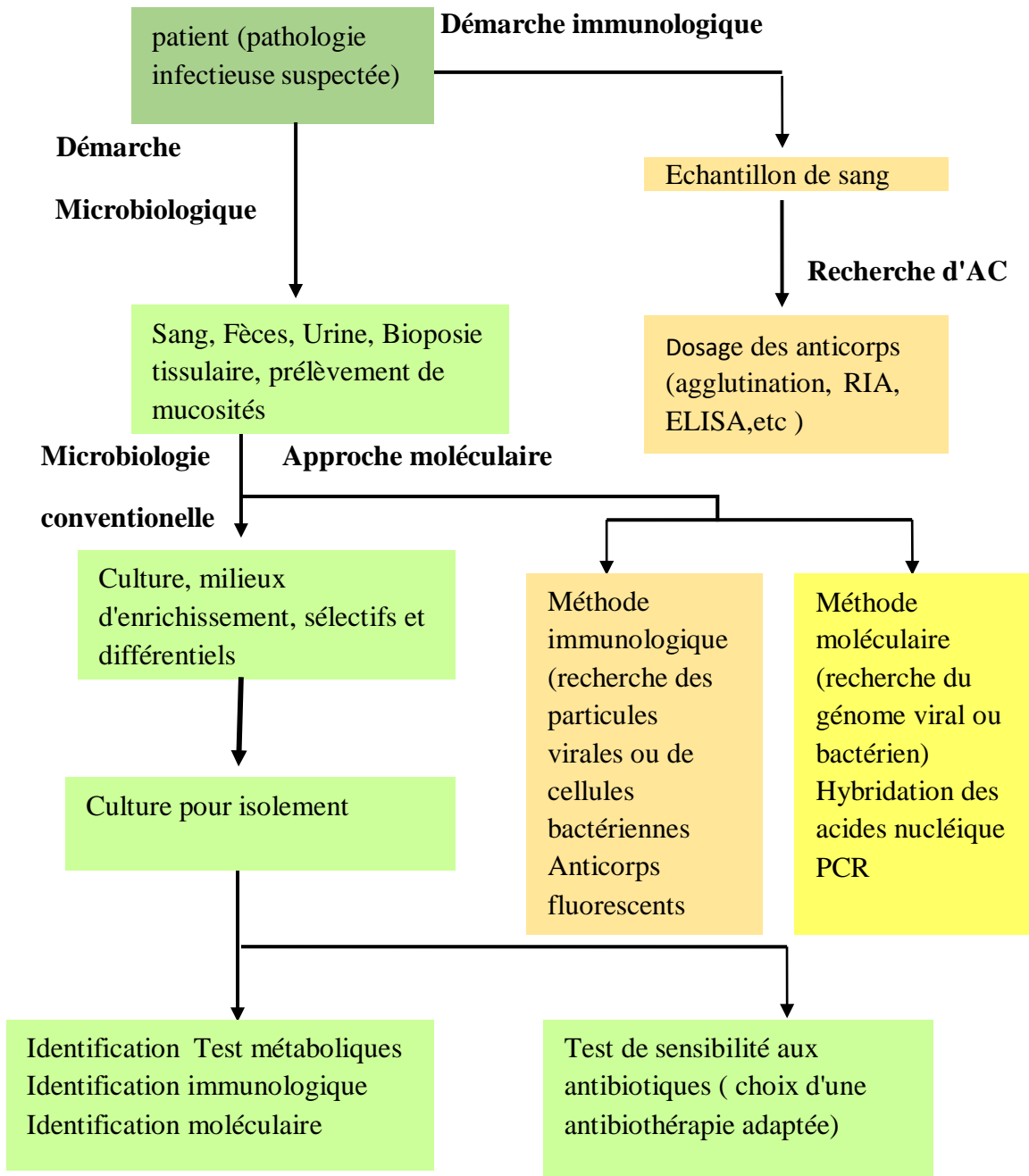


Fig. 14: Les étapes d'analyses microbiologies médicales (Madigan & Martino, 2007).

#### 4-1- Prélèvement:

D'une manière générale, les résultats fournis par le laboratoire clinique ne sont bons que dans la mesure où l'échantillon est correct, les échantillons sont prélevés de différentes manières par des techniques aseptiques, visant à prévenir la contamination de l'échantillon avant son arrivée au laboratoire clinique. Chaque méthode est conçue pour que seul le matériel approprié soit envoyé au laboratoire (Prescott, 2016).

- **Responsabilités:** Les prélèvements sont réalisés par les personnels habilités. Lorsque le prélèvement est effectué par le patient, la personne présente à l'accueil a la responsabilité de donner les préconisations aux patients et d'identifier les échantillons (Marsot & Duverneuil, 2009).

➤ **Prélèvement de selle:** prélèvement de la totalité des selles dans un récipient à large ouverture. Les selles doivent être apportées rapidement au laboratoire. L'idéal est d'obtenir une exonération au laboratoire, surtout pour la recherche de protozoaires.

➤ **Prélèvement génital chez l'homme :** lorsqu'il existe un écoulement urétral, recueillir le pus ou la sérosité qui s'écoule à l'orifice urétral sur une lame porte-objet et sur un écouvillon.

Si l'on recherche une *Chlamydia* ou un mycoplasme, il est nécessaire d'obtenir des cellules urétrales, soit par grattage de la muqueuse à 2 ou 3 cm de l'orifice au moyen d'une curette ophtalmologique émoussée, soit par un écouvillon en dacron.

L'écouvillon est envoyé au laboratoire dans un étui contenant si possible un milieu de transport (type Portagerm®) (Caquet, 1994).

➤ **Prélèvement génital chez la femme :** après mise en place d'un speculum, les prélèvements se font au centre des lésions observées, dans les sécrétions vaginales, le cul-de-sac postérieur, sur l'exocol (éventuellement l'endocol), avec chaque fois un écouvillon différent. Lorsqu'un écoulement purulent est repère (orifice d'une glande de Bartholin, méat urétral...), il est prélevé à la pipette.

La recherche de *Chlamydia* s'effectue à l'aide d'un écouvillon en dacron de façon à ramener une quantité suffisante de cellules nécessaires à l'étude de ces bactéries cytoparasites (Caquet, 1994).

-Prélèvement dans le canal endocervical: La recherche de *Treponema pallidum* se fait à partir des produits de grattage (sérosité de « seconde venue »), du chancre ou par ponction ganglionnaire.

Dans ces deux derniers cas, l'examen direct sur lame est fait au laboratoire. Sinon envoyer les écouvillons dans un étui contenant un milieu de transport (type Portagerm®) (Caquet, 1994).

➤ **Prélèvement de gorge:** Sujet assis, bien éclairé. Deux écouvillons stériles sont appliqués de façon exclusive sur les deux amygdales et la paroi postérieure du pharynx. L'un des écouvillons sert à faire un étalement sur lame, l'autre à la culture.

Tous deux sont envoyés au laboratoire dans un étui muni de préférence d'un milieu de transport (type Portagerm®) (Caquet, 1994).

➤ Les échantillons de **sang**, de **pus** et de **liquide céphalorachidien** sont prélevés par **aspiration à la seringue**. En appliquant des techniques aseptiques strictes, l'échantillon est recueilli dans un tube stérile additionné d'un anticoagulant tel que l'héparine ou le citrate sodique. L'anticoagulant empêche les micro-organismes d'être pris dans un caillot (Prescott, 2016).

➤ **L'intubation** (du latin, in, dans et tuba, tube) consiste à introduire un tube dans un canal ou organe creux du corps. Par exemple, on recueille des échantillons de **l'estomac** par intubation. Un long tube stérile est attaché à une seringue et le tube est soit avalé par le patient soit introduit dans son estomac par la voie nasale. Des échantillons sont alors prélevés périodiquement dans la seringue stérile. Le tube de Levin est le plus souvent employé pour les intubations (Prescott, 2016).

➤ Un cathéter est un instrument tubulaire destiné à prélever ou introduire des liquides dans **un organe**. Par exemple, on peut obtenir des échantillons d'**urine** à l'aide de cathéters pour détecter une infection urinaire et ceci en particulier chez des bébés nouveau-nés ou prématurés. Les cathéters sont de trois types. Le cathéter dur est employé lorsque l'urètre est très étroit ou présente des constrictions. Le cathéter de French est un tube souple pour l'obtention d'un échantillon d'urine unique. Si on veut des échantillons multiples au cours d'une période prolongée. Le cathéter de Foley est utilisé (Prescott, 2016).

L'**urine** peut aussi être obtenue proprement en respectant les consignes suivantes. Après que le patient se soit lavé le méat urétral (l'orifice du canal), l'urine est récoltée dans un récipient. Le meilleur prélèvement se fait tôt le matin, car l'urine, stockée dans la vessie toute la nuit, contiendra plus de micro-organismes. Dans cette technique, on ne récolte pas la première urine, qu'elle sera contaminée par les micro-organismes transitoires, normalement présents dans la partie inférieure de l'urètre. Par contre, on récolte le flux suivant d'urine, qui contiendra vraisemblablement des micro-organismes présents dans la vessie. Si nécessaire, on récolte aussi de l'urine directement pour aspiration à la seringue dans la vessie (Prescott, 2016).

➤ **Crachats** et le matériel provenant des voies respiratoires, elle contient les sécrétions muqueuses expectorées des poumons, des bronches et de la trachée par la bouche, contrairement à la salive sécrétée par les glandes salivaires. Les crachats sont récoltés dans des coupes

spéciales, doivent être striées sur de la gélose au sang ou de la gélose « chocolat ». La gélose au sang est utile pour la culture de *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, et *Staphylococcus aureus*. *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* peuvent être détectés sur de la gélose « chocolat » (Perry & Staley & Lory, 2004).

➤ Pour les échantillons de **peau** et de **muqueuses** (œil, oreille, nez, gorge, plaie ouverte), on emploie le plus souvent un **écouvillon** stérile, fait d'une tige de polystyrène dont le sommet est recouvert de dacron, d'alginate de calcium ou de rayonne, les fabricants d'écouvillons ont développé différents récipients, accompagnés du mode d'emploi. Ainsi, beaucoup d'écouvillons disponibles sur le marché sont plongés dans un milieu de transport protégeant certains micro-organismes et prévenant la multiplication des germes à croissance rapide. Cependant, il vaut mieux ne pas utiliser les écouvillons (sauf pour les narines et la gorge) car leur capacité est limitée (< 0,1ml) et ils ont un plus grand risque de contamination par des micro-organismes superficiels (Marsot & Duverneuil, 2009).

Et d'autre prélèvements bactériologiques résumés dans tableau 6.

**Tableau 6:** Prélèvement bactériologique (Marsot & Duverneuil, 2009).

Nature du prélèvement	Mode de prélèvement	Matériels
Sperme (spermoculture)	Après 2 jours d'abstinence minimum, 8 jours maximum <ul style="list-style-type: none"> <li>• Se laver les mains</li> <li>• Uriner</li> <li>• Par masturbation, après une désinfection locale.</li> <li>• Recueil de la totalité de l'éjaculat</li> </ul>	Flacon stérile apporté au laboratoire dans un délai d'une demi-heure
Recherche de dermatophytes : Ongles, cheveux, squames	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prélever de préférence à la périphérie des lésions des squames à l'aide d'un vaccinostyle ou d'une curette</li> <li>• En cas de teigne, épiler les cheveux susceptibles d'être atteints</li> <li>• Pour les ongles, couper avec la pince à ongle toute la partie de l'ongle atteinte, gratter à la limite de la zone saine avec un vaccinostyle ou d'une curette</li> <li>• En cas de lésion suintante, écouvillonner le pus et gratter le plancher de la lésion</li> </ul>	Boîtes de Pétri stériles Vaccinostyle ou lame de bistouri



## 4-2- Manipulation :

Immédiatement après son prélèvement, l'échantillon doit être correctement étiqueté. La personne effectuant le prélèvement est responsable de l'inscription correcte et lisible du nom sur la demande d'analyse, numéro d'enregistrement à l'hôpital, de l'adresse de l'hôpital, du diagnostic, du traitement antimicrobien en cours, du nom du médecin responsable, de la date d'admission et du type d'échantillon. Cette information doit correspondre à celle écrite ou imprimée sur une étiquette apposée sur le récipient contenant l'échantillon. Le type ou l'origine de l'échantillon, ainsi que le choix des analyses demandées doivent être précises sur le formulaire de demande (Prescott, 2016).

## 4-3- Transporte Des Echantillons :

➤ **Echantillons prélevés du laboratoire :** Le transport des échantillons de la salle de prélèvement à la technique est assuré par les préleveurs, le plus rapidement possible, ils sont déposés sur la paillasse de tri, le technicien les prépare en fonction des analyses à réaliser (INSTITUT ALFRED FOURNIER, 2019).

➤ **Echantillons prélevés à l'extérieur du laboratoire :** Sont acheminés au laboratoire par le préleveur à la fin de sa tournée, toutefois en cas d'urgence, on si l'échantillon nécessite un prétraitement particulier (congélation immédiate, centrifugation rapide, ... etc.). Le préleveur ramène les échantillons au laboratoire avant de poursuivre sa tournée. Les échantillons sont déposés dans des boîtes en plastique qui est mise dans un sachet en plastique, les protégeant des chocs et de la lumière, ces boîtes sont transportées dans une mallette de prélèvement sur laquelle est apposée une étiquette « Echantillon de diagnostic », le préleveur dépose les boîtes sur la paillasse de tri en technique (INSTITUT ALFRED FOURNIER, 2019).

➤ **Echantillon transportés entre laboratoire de la SEL et/ou du groupement :**

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire exécutant par le coursier en respectant la règle du triple emballage :

Les échantillons sont déposés sur un portoir placé dans une boîte, puis dans la mallette de transport sur laquelle est apposée une étiquette « Echantillon de diagnostic ».

\* Cas particulier pour le plateau technique de bactériologie : Les échantillons ensemencés ou mis en culture doivent être transportés dans un emballage secondaire rigide, puis dans un emballage tertiaire sur lequel sont mentionnés le nom du laboratoire préleveur, le nom du laboratoire exécutant et le logo « risques infectieux ». Le coursier est formé pour ce type de transport et son véhicule est signalé (Duverneuil & Marsot, 2009).

## 4-4- Identification Des Microorganismes :

Le laboratoire de microbiologie clinique peut fournir une identification provisoire ou définitive des microorganismes contenus dans un échantillon, basée sur l'examen microscopique de l'échantillon, la croissance et les caractères biochimiques de micro-organismes isolés, des tests immunologiques pour la détection d'anticorps ou d'antigènes microbiens, le typage par bactériophage (réserve aux laboratoires de recherche et de contrôle) et des méthodes moléculaires (Prescott, 2016).

#### 4-4-1- La Microscopie :

des échantillons non fixes, fixes à la chaleur ou chimiquement peuvent être examinés au microscope optique à fond clair, au microscope à contraste de phase ou à fond noir. Le microscope à fond noir est employé de préférence pour la recherche de spirochètes dans des lésions de la peau de patients avec une syphilis primaire ou dans le sang de patients atteintes d'une leptospirose débutante. Le microscope à fluorescence est employé pour l'identification de certains micro-organismes acido-alcool-résistants (*Mycobacterium tuberculosis*) après coloration avec des fluorochromes. (certains caractères morphologiques utilisés dans la classification et l'identification des micro-organismes) (Prescott, 2016).

La coloration (de Gram et la coloration acido-alcool-résistante) et l'examen visuel au microscope de certains échantillons ne sont pas nécessairement intéressants. L'échantillon d'une origine donnée contiendra généralement une grande variété de microorganismes, et l'examen microscopique n'indiquera pas lequel est l'agent de l'infection. Dans ce cas, les échantillons sont inoculés directement sur ou dans un milieu de culture approprié. Le milieu utilisé dépendra de l'origine de l'échantillon (Perry & Staley & Lory, 2004).

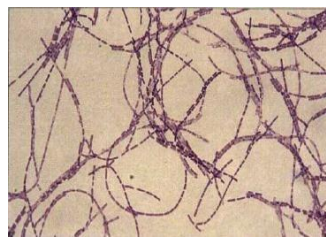


Fig .15: Coloration de Gram (Shears & Hart, 1997).

#### 4-4-2- Croissance Et Les Caractères Biochimiques :

Les micro-organismes ont été identifiés sur base de leur croissance ou de caractères biochimiques. Ces critères spécifiques varient selon que le microbiologiste clinicien est confronté à l'identification de virus, de rickettsies, de chlamydiae, des mycoplasmes, de bactéries

Gram-positives ou négatives, de champignons (levures ou moisissures) ou de parasites (protozoaires ou helminthes) (Prescott, 2016).

➤ **Virus** : Les virus sont identifiés par leur isolement dans des cellules vivantes par des tests sérologiques (anticorps fluorescents, tests Elisa, radio-immuno-essais, agglutination de billes de latex et test à la peroxydase) ou par des techniques de biologie moléculaire (analyse par endonuclease de restriction, hybridation, et réaction de polymérisation en chaîne). Plusieurs sortes de cellules vivantes sont disponibles : cultures de cellules, œufs de poules embryonnés et animaux d'expérience.

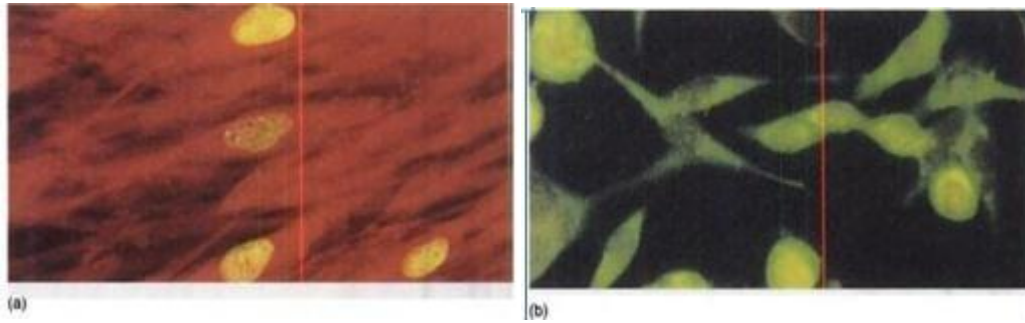
Les cultures cellulaires sont divisées en trois classes générales :

1. Des cultures primaires consistent en cellules isolées directement des tissus, tels le rein et le poumon.
2. Des cultures cellulaires semi-continues résultent de la sous-culture de cultures primaires et contiennent habituellement des fibroblastes diploïdes, qui se divisent un nombre limité de fois,
3. Des cultures cellulaires continues sont dérivées de cellules transformées, le plus souvent d'origine épithéliale. Ces cultures se caractérisent par une croissance rapide, une hétéroplôidie (le nombre de chromosomes n'est pas un multiple simple du nombre haploïde) et la capacité d'être sous-cultivées indéfiniment.

Chaque type de culture cellulaire permet la multiplication d'un ensemble différent de virus, de même que les milieux de culture ont des propriétés sélectives pour la croissance de bactéries,

La réplication virale dans les cellules en culture est mise en évidence de deux manières :

Un **effet cytopathique** est une modification visible des cellules suite à la réplication virale. Des exemples de ces modifications sont le ballonnement, la liaison entre elles, l'agglomération ou même la mort des cellules en culture. Au cours de l'incubation des cellules, on peut y ajouter des globules rouges. Plusieurs virus modifient la membrane cytoplasmique des cellules infectées de telle sorte que les globules rouges y adhèrent fermement. Ce phénomène est appelé l'**hemadsorption**.



**Fig.16** : Test d'identification virale par immunofluorescence en culture de tissu, (a) deux noyaux infectés par le cytomégalovirus (CMV) dans une culture de tissu positive. (b) plusieurs cellules infectées par le virus herpes simplex dans des culture cellulaire (**Prescott, 2016**).

Des œufs embryonnaires de poule peuvent être utilisés pour isoler des virus. Il y a trois voies d'inoculation : (1) l'allantoïde, (2) le sac amniotique et (3) la membrane chorio-allantoïdienne. La réplication virale s'accompagne de l'apparition de taches (« packs ») sur la membrane chorio-allantoïdienne, par la mise en évidence d'hémagglutinines dans les liquides allantoïques et amniotique et par la mort de l'embryon.

Des animaux de laboratoire, en particulier les souris, peuvent servir à isoler des virus. On observe l'apparition de symptômes spécifiques ou la mort des animaux inoculés.

Plusieurs nouveaux tests sérologiques d'identification virale utilisent l'immunofluorescence avec anticorps monoclonaux. Ces tests mettent en évidence des virus tels que le cytomégalovirus et virus herpes simplex dans des cultures de tissus (**Prescott, 2016**).

➤ **Mycètes** : Les infections fongiques, à levures ou moisissures, sont souvent diagnostiquées par examen microscopique (à fluorescence) direct des échantillons. Par exemple, la mise en évidence de moisissures se fait en mélangeant une partie de l'échantillon avec une goutte d'hydroxyde de potassium 10% sur une lame en verre, qui est ensuite couverte d'une lame couvre-objet, fixées légèrement à la flamme et examinée au microscope, la mise en culture peut également être envisagée, mais la croissance et l'identification prennent quelque jours à plusieurs semaines selon l'organisme. La sérologie (i.e., fixation du complément et immunodiffusion) est une méthode de choix pour détecter les anticorps sériques mais est limitée à quelques mycètes (*Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*). Le test avec antigènes cryptococciques sur latex est utilisé en routine pour détecter *Cryptococcus neoformans* dans le sérum et le liquide céphalorachidien. On dispose également de trousse et de méthodes automatiques pour l'identification rapide des levures (4 à 24 h). Toute méthode biochimique doit être accompagnée d'une recherche morphologique d'hyphe, de cellules de levures, de chlamydospores, etc. (**Prescott, 2016**).

➤ **Bactéries** : Il faut isoler et faire croître les bactéries avant de pouvoir utiliser les tests diagnostiques qui confirmeront l'identification de l'agent pathogène. La croissance bactérienne se manifeste par l'apparition de colonies sur milieux solides ou de turbidité dans des milieux liquides. Le temps requis pour une croissance observable est une variable importante au laboratoire clinique : Alors que la croissance de la plupart des bactéries pathogènes est déjà visible après quelques heures, les colonies de mycobactéries ne deviennent évidentes qu'après plusieurs semaines. Le microbiologiste, ainsi que praticien, doivent être conscients d'un délai de réponse raisonnable pour différentes cultures. L'identité initiale d'un organisme bactérien est suggérée par (1) le type d'échantillon mis en culture : (2) son apparence au microscope : (3) sa croissance sur des milieux sélectifs, différentiels, d'enrichissement ou caractéristiques, et (4) ses propriétés hémolytiques, métaboliques et de fermentation sur les différents milieux. Après examen des caractéristiques microscopiques et de croissance d'une bactérie, des tests biochimiques spécifiques peuvent être effectués. Ces tests représentent la méthode la plus courante pour l'identification des bactéries. Les bactéries contenues dans un échantillon sont identifiées en appliquant des clés de répartition dichotomiques aux tests biochimiques. Habituellement, moins de 20 tests suffisent pour identifier un isolat clinique en tant qu'espèce (**Prescott, 2016**).

➤ **Parasites** : Des préparations aqueuses et concentrées de selles ou d'urines peuvent être examinées au microscope pour rechercher des œufs, des cystes, des larves ou des cellules végétatives de parasites. Des frottis de sang sont soumis à la coloration de Giemsa pour la recherche des protozoaires de la malaria ou des trypanosomes. Des tests sérologiques sont également utilisés (**Prescott, 2016**).



**Fig.17:** Parasite par l'observation microscopique (Trypanosoma sp) (**Shears & Hart, 1997**).

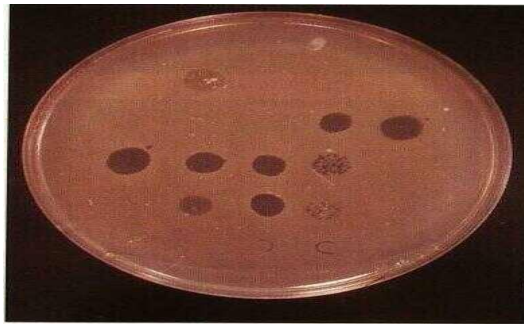
### 4-4-3- Techniques Immunologiques (antigène/anticorps) :

Pratiquement toutes les espèces microbiennes et dans beaucoup de cas, une souche d'un microorganisme pathogène possède au moins un composant antigénique qui lui sera spécifique. Des techniques analytiques sont aujourd'hui disponibles pour obtenir et purifier ces antigènes spécifiques. Un antigène purifié peut être utilisé pour générer un *anticorps monoclonal* qui réagira spécifiquement avec cet antigène. Les anticorps monoclonaux d'antigènes spécifiques sont un outil de diagnostic efficace, hautement spécifique et rapide.

ELISA est un acronyme pour « *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay* », et il existe deux tests ELISA, l'un direct (de type sandwich, utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques pour la détection d'un antigène) et l'autre indirect (pour déterminer la présence d'un anticorps spécifique dans le sérum humain) (Perry et al, 2004).

### 4-4-4- Typage Par Phages (lysotypie) :

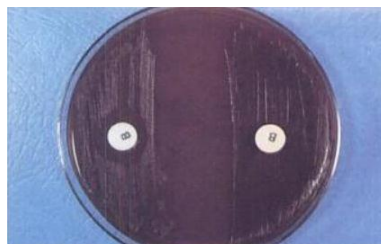
Les virus bactériens sont très spécifiques de l'espèce ou dans de nombreux cas, de souche bactérienne qu'ils peuvent infecter. Cette spécificité est basée sur la présence de récepteurs viraux à la surface de la bactérie où le virus s'attache pour commencer le processus d'infection. La susceptibilité des souches bactériennes aux virus peut constituer une indication sur le genre, l'espèce et éventuellement la souche. La susceptibilité aux virus peut être déterminée en étalant une souche donnée sur une surface gélosée. La surface est divisée en carrés en marquant avec un crayon indélébile le dessous de la boîte. Puis une sur chaque carré ainsi délimite. Après une incubation appropriée pour la croissance bactérienne, la boîte est examinée pour la présence de plages de lyse, indiquant lequel des virus est capable d'attaquer cette bactérie. Le typage, par les phages est utile pour suivre à la trace des épidémies localisées comme dans le cas d'intoxication alimentaires (Perry et al, 2004).



**Fig.18 :** Typage phagique de *Staphylococcus aureus* (lysotypie) Une culture en bouillon de *S. aureus* estensemencée sur une gélose nutritive, et différents phages sont déposés selon un plan prédéfini. Après incubation, le profil de lyse indique le lysotype de la souche (gélose nutritive, 18 h à 37°C) (Shears & Hart, 1997).

#### 4-4-5- Test De Sensibilité :

Les antibiotiques ou agents chimiothérapeutiques sont des traitements disponibles pour de nombreuses infections par des bactéries et champignons (Perry et al, 2004). Beaucoup de microbiologistes cliniciens pensent que la détermination de la sensibilité d'un microorganisme à des agents antibactériens, est un des tests les plus importants effectués dans leur laboratoire, les résultats (fig.22), en effet, peuvent montrer les substance auxquelles un micro-organisme est le plus sensible, ainsi que les doses thérapeutiques requises dans le traitement de la maladie infectieuse. Il y'a des tests de sensibilité par dilution, par diffusion à l'aide de disques (la méthode de Kirby-Bauer) et le dosage de ces médicaments dans le sang (Prescott, 2016).



**Fig.19:** Test de sensibilité à la bacitracine, les bactéries à gauche sont présumées être des streptocoques du groupe A, inhibées par l'antibiotique bacitracine, les bactéries à droite (*Enterococcus faecalis*) sont résistantes à la bacitracine (Shears & Hart, 1997).

#### 4-4-6- Ordinateurs En Microbiologie Clinique :

Les ordinateurs améliorant l'efficacité du laboratoire et les résultats sont acheminés au médecin plus rapidement et avec plus de précision.

Les demandes d'analyse sont introduites dans l'ordinateur directement au laboratoire ou dans l'unité hospitalière. Les rubriques comprennent un numéro d'identification, les renseignements concernant le patient et des requêtes spécifiques. Après introduction de la demande d'analyse, le système doit permettre la poursuite du travail habituel avec l'échantillon clinique marqué, la date, le numéro d'identification et la liste des analyses demandées. Après obtention des résultats, ceux-ci sont inscrits dans un cahier de laboratoire et puis introduits dans l'ordinateur. Afin de répondre aux exigences multiples de l'encodage en microbiologie, l'ordinateur doit disposer de moyens d'introduction rapides et souples. Le rapport imprimé avec les résultats d'analyses est produit par l'ordinateur. Les programmes d'impression doivent permettre une mise en page flexible de ces rapports afin de pouvoir y inclure des données additionnelles. En plus de fournir les rapports avec les résultats d'analyses de routine, les ordinateurs peuvent également faire le relevé des échantillons, de la liste des analyses encore à faire, des statistiques en vue du contrôle de qualité, des probabilités de sensibilité aux agents antimicrobiens, des données épidémiologiques de l'hôpital et bien d'autres tâches. L'ordinateur peut être relié à différents instruments automatisés du laboratoire en vue du calcul rapide et exact des résultats et de leur transfert (**Prescott, 2016**).



*Conclusion*

## **Conclusion**

L'objectif de ce travail se résume en une étude des bases fondamentale des analyses microbiologiques dans le domaine alimentaire, et médical.

Ce qui nous a permis de conclure que : Les analyses microbiologiques sont des outils pour confirmer ou infirmer une contamination. Ces analyses qui passent aux mêmes étapes :

- \* Echantillonnage ;
- \* Prélèvement ;
- \* Transport et Identification.

Mais elles sont différenciées selon la nature de domaine et la méthode qui est réalisé et le résultat obtenus.

Enfin, il est judicieux d'utiliser des techniques et méthodes bien développées pour raccourcir le temps d'analyse et assurer un bon service de diagnostic médical et d'intérêt alimentaire pour préserver la santé publique et faire avancer le domaine de la microbiologie.

***Références  
bibliographiques***

## Référence Bibliographique

1. Abakhti, A. (2011). Technique de contrôle microbiologique. Alger : Université Mohamed kheider Biskra\_cours.
2. Ait Abdeluoahab, N. (2007). Microbiologie Alimentaire(2<sup>ème</sup>éd). Alger : Office Des Publications Universitaires.
3. Analyse physico-chimique et microbiologique du Thon en conserves. Présenté par : BELAHAUCINE Fatiha & GARECHE Mohamed & MESSAOUD Mohamed.
4. Arthur Gaveau. 2016. Etude des mécanismes de transfert de bactéries déformables en microfiltration frontale. Environnement et Société. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. ffNNT : 2016TOU30046ff. fftel-01523275f
5. BENGUETTAT Batoul Fatima Zohra, 2020 Agents pathogènes bactériens Et Techniques d'identification. Mémoire de fin d'études Pour l'obtention du diplôme de Master en Biologie Spécialité: Microbiologie appliquée, Université de Mostghanem. Algérie.
6. Branger, A., Richer, M.-M., Roustel, S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques(1<sup>ère</sup>éd). Dijon : educagri.
7. Caquet, R. (1994). Guide Pratique des Examens De Laboratoire(6<sup>ème</sup>éd). Paris : Gazette Médicale.
8. Cornu, M. (2000). Dynamique des populations bactériennes en cultures mixtes. Thèse De Doctorat, L'université Claude Bernard, Lyon I, Laboratoire Biométrie et Biologie Evolutive, Paris.
9. Cuq, J.-L. (2007). Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Microbiologie Alimentaire. anonyme: UM2.cours.
10. Daikh T., Dafri F. (2017). Contrôle qualité physico-chimique et microbiologique de la Fluvastatine LDM 80 mg. Université Frères Mentouri Constantine 1.
11. Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire(éd). Paris : Lavoisier.
12. Guiraud, J.-P. (1998). Microbiologie Alimentaire(éd). Paris : Dunod.
13. Guy, I., Jean, N.-J. (2006). Microbiologie Technique(4<sup>ème</sup> éd). .... : Scérén.
14. Kabali, E.; Pandey, G.S.; Munyeme, M.; Kapila, P.; Mukubesa, A.N.; Ndebe, J.; Muma, J.B.; Mubita, C.; Muleya, W.; Muonga, E.M.; et al. Identification of Escherichia coli and Related Enterobacteriaceae and Examination of Their Phenotypic Antimicrobial Resistance Patterns: A Pilot Study at A Wildlife–Livestock Interface in Lusaka, Zambia. Antibiotics 2021, 10, 238. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030238>.
15. Khenfouf H., Maameri D. (2020). Analyse de l'eau purifiée utilisée dans le groupe SAIDAL Constantine 2. Université l'Arbi Ben M'hidi Oum El-Bouaghi.
16. Madigan, M., Martinko, J. (2007). Biologie des micro-organismes(11<sup>ème</sup>éd). France : PEARSON Education.

17. Marsot, C., Duverneuil, J.-L. (2009). Manuel De Prélèvement(éd). anonyme: Laboratoire D'analyse Médicales De Brignais.
18. Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en biologie.
19. Mouffok, F. (2000). Cours National D'hygiène Et De Microbiologie Des Aliments(éd). Alger : Institut Pasteur D'algerie\_ cours.
20. Organisation Mondiale de La Santé. (1993). Parasitologie Médicale (ISBN 92 4 2544108). Genève : O M S. consulté le 1997.
21. Perry, J.-J., Staley, J.-T., Lory, S. (2004). Microbiologie(éd). Paris : Dunod.
22. Qualité du beurre local : cas du beurre de chèvre, Aziz Nabila, Hamiroun Assia, Labrèche Amel, 2009.
23. Shears, P., Hart, T. (1997). Atlas de Poche de Microbiologie(éd). France : Médecine-Sciences Flammarion.
24. World Health Organization, 2014..Système de Gestion de la Qualité au Laboratoire: Manuel (French Edition) Illustrated Edition ISBN-13: 978-9242548273. ISBN-10: 9242548278.

**Site web :**

1. <http://www.sciencepresse.com>. 23Mai2012.
2. <http://www.ilm.com>. 23MAI2012 .
3. <http://www.Secnde STL.euro.bioweb.eu.com>. 23Mai2012.
4. <http://www.iaqsource.com>.23Mai2012.
5. <http://www.cybe.fr>.23Mai2012.
6. <http://www.pages.v usherbrovle.ca.com>.23Mai2012.
7. <http://www.cchst.ca.com>.23Mai2012.
8. <http://www.tsirefrigeration.com>.23Mai2012.

## **Résumé :**

Dans notre étude, nous allons aborder «Les bases fondamentales des analyses microbiologiques » pour rechercher et identifier les microorganismes (bactéries, champignons microscopique, virus et protozoaires...) dans le domaine Alimentaire et Médical.

Ces analyses sont des successions des étapes suivantes : échantillonnage, prélèvement, transport et identification des germes après le traitement d'échantillon. Les analyses sont réalisées pour définir la qualité d'aliment et pour mettre en place un traitement approprié pour les patients (homme et animaux). Les techniques d'analyses sont en développement continu pour automatiser les protocoles analytiques, améliorer les méthodes d'analyses pour répondre aux besoins de rapidité et d'exactitude des résultats.

**Les mots clé :** Echantillon, prélèvement, dilution et identification

## **Summary :**

In our study, we will approach "The fundamental bases of microbiological analyses" to search for and identify microorganisms (bacteria, microscopic fungi, viruses and protozoa, etc.) in the Food and Medical field.

These analyzes are a succession of the following steps: sampling, collection, transport and identification of germs after sample processing. Analyzes are carried out to define the quality of food and to set up an appropriate treatment for patients (humans and animals). Analytical techniques are constantly being developed to automate analytical protocols, improve analytical methods to meet the needs for speed and accuracy of results.

**Key words:** Sample, sampling, dilution and identification..

## **ملخص :**

في دراستنا، سنتناول "الاسس الأساسية للتحليلات الميكروبيولوجية" للبحث عن الكائنات الحية الدقيقة والتعرف عليها (البكتيريا والفطريات المجهرية والفيروسات والأوليات...) في مجال الغذاء والطب. هذه التحليلات هي سلسلة من الخطوات التالية: اخذ العينات والجمع والنقل وتحديد الجراثيم بعد معالجة العينة يتم اجراء التحليلات لتحديد جودة الطعام ولاعداد العلاج المناسب للمرضى (البشر والحيوانات). يتم تطوير التقنيات التحليلية باستمرار لاتمة البروتوكولات التحليلية, وتحسين الاساليب التحليلية لتلبية احتياجات سرعة ودقة النتائج.

الكلمات المفتاحية: العينة, اخذ العينات, التخفيف, التحديد.