



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Intitulé :

Etude de *Cronobacter sakazakii* dans la poudre de lait infantile

Préparé par : RAMOUL Ghofrane
KHITMI Lodjein

Le : 07/11/2020

Jury d'évaluation :

Président du jury : SEKHRI- ARAFA Nedjoua (M.C. A) –UFM Constantine

Rapporteur : BOUZERAIB Latifa (M.A.A) - UFM Constantine.

Examineurs : CHABBI Rabah (M.A.A) - UFM Constantine.

Année universitaire 2019- 2020

Remerciements

C'est grâce à Allah le miséricordieux que l'aube du savoir à évacuer l'obscurité de l'ignorance et le soleil de la science à éclairer notre chemin pour réaliser ce modeste travail.

*Nous adressons nos remerciements à madame **BOUZERAIB LATIFA** notre encadreur pour l'effort fourni, pour ses aides et gentillesse, pour les conseils qu'elle nous a prodigués, sa patience et sa persévérance dans le suivi tout au long de la réalisation de ce travail, ainsi que pour sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.*

Nos remerciements ne sont jamais assez pour vous Madame.

Nous remercions également à

*Madame « **SEKHRI NEDJEOUA** » pour l'honneur qu'elle nous a fait en présidant ce jury. Qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect. À Monsieur « **CHABBI RABAH** » d'avoir accepté d'apporter son jugement à ce travail.*

Enfin nos remerciements s'adressent vivement à tous les professeurs qui nous ont aidé et soutenu tout au long de notre cursus.

Nous n'oublierons pas de remercier tous ceux et celles qui nous ont aidés d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.

MERCI à tous

Dédicaces

Avant tout je tiens à remercier ALLAH, le tout puissant de m'avoir donné suffisamment de courage et surtout de patience pour réaliser ce modeste travail.

« La réussite ne se trouve pas dans la meilleurs des places ; la plus haute ou la plus payante mais dans le maximum qu'on peut tirer de soi-même »

RENAURD TREMBLAY

Je dédié ce travail :

A ma chère mère RAHIMA qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils ; Pour toute son assistance et sa présence dans ma vie ; reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte.

A mon cher père NOUREDDINE signe de fierté et d'honneur, ce travail est le vôtre, trouvez ici toute mon affection et ma gratitude profonde pour toutes ces années de sacrifice pour moi.

Puisse dieu, le très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon fiancé Ilyes, depuis que nous nous sommes connus, tu as toujours été présent, tu as su m'apporter soutien et réconfort quand j'en avais le plus besoin. Merci pour ta compréhension, ton bon sens et ton amabilité. Aucune dédicace ne saurait

exprimer à sa juste valeur l'amour, l'estime et le respect que j'éprouve pour toi. Qu'ALLAH bénisse notre couple.

A mes très chères et meilleurs sœurs Nour el imen, Nourhane ,Khadidja et Dorsafe ,merci énormément pour vos soutiens plus que précieux.

*A ma jolie nièce **Iline** , que tu puisses suivre mes traces et tu fasses plus que moi. Je t'aime beaucoup.*

A mes neveux, Anes et Mouayade mes anges ; que dieu vous garde et vous protège.

*A tous mes collègues et mes amies : **LOUDJEINE, NOUHED, Fairouz**, en témoignage de l'amitié qui nous a unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

Ghofrane.R

Dédicaces

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, Le respect et la reconnaissance.

Je dédie ce travail :

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Fariha

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

A MON TRÈS CHÈRE PÈRE : Ahmed

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. Que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mon cher grand-père paternel

Que ce modeste travail, soit l'expression de vœu que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.

A mes chères sœurs RAWANE et HANINE pour leurs encouragements permanents et leur soutien moral.

A mes chers frères MONCEF et ABD EL DJALILE pour leur appui et leur encouragement.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A tous mes collègues et mes amies : GHOFRANE, FAIROUZ ET SALSABIL.

Vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

LODJEIN .K

Résumé

Le lait infantile est généralement considéré comme étant un produit de bonne qualité microbiologique, sans risque d'altération. Cependant, des agents microbiens peuvent contribuer à modifier ses propriétés qui réduisent sa durée de conservation et par conséquent exposées aux risques de contamination, il est un vecteur potentiel de la transmission de l'espèce pathogène *Cronobacter sakazakii* qui peut occasionner des intoxications chez le consommateur.

L'objectif de ce travail est l'étude morphologique, biochimique et la détermination de la résistance aux antibiotiques de l'espèce *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii*) recherchée. Le genre *Cronobacter* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il comprend dix espèces, toutes ces espèces à l'exception de *C. condimenti*, ont été liées à des maladies humaines et peuvent entraîner une série de maladies infectieuses, notamment des infections des voies urinaires, une conjonctivite et une pneumonie.

Devant la crise sanitaire du COVID19, notre étude s'est inspirée des résultats obtenus de la littérature, qui montrent que l'enrichissement dans de l'eau péptonée et l'isolement sur milieux Mac Conkey, VRBG et TSA à 37°C pendant 18 à 24 heures, s'est révélé être une méthode efficace pour l'isolement de l'espèce de *Cronobacter sakazakii* à partir des échantillons de poudre de lait infantile. Cette espèce présente les caractéristiques suivantes : bacilles à Gram négatif, oxydase -, catalase +, glucose +, mannose +, H₂S -, uréase -, indole-, TDA -, incapable de réduire les nitrates en nitrites, VP -, mannitol +, elle est mobile à 39°C, ONPG +, ADH +, ODC - et utilisent le citrate comme seule source de carbone.

Les souches de *Cronobacter sakazakii* présentent une résistance aux antibiotiques vis-à-vis de l'ampicilline et de l'imipénème, cependant, elle est sensible à la gentamycine, à l'amikacine, au chloramphénicol, à la tétracycline et à la ciprofloxacine.

Mots clés : *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter sakazakii*, isolement, enrichissement, le lait infantile.

Abstract

Infant milk, is generally considered to be a good microbiological product, with no risk of alteration. However, microbial agents may contribute to changes in its properties which reduce its shelf life and therefore expose it to the risk of contamination, it is a potential vector of transmission of the pathogenic species *Cronobacter sakazakii* which can cause poisoning in the consumer.

The objective of this work is the morphological, biochemical study and the determination of antibiotic resistance of the species *Cronobacter sakazakii* (formerly *Enterobacter sakazakii*) sought. The genus *Cronobacter* belongs to the family *Enterobacteriaceae*. It consists of ten species, all except *C. condimenti*, have been linked to human diseases and can lead to a range of infectious diseases, including urinary tract infections, conjunctivitis and pneumonia.

Given the health crisis of COVID19, our study was inspired by the results obtained from the literature, which show that enrichment in peptone water and isolation on Mac Conkey, VRBG and TSA media at 37°C for 18 to 24 hours, was found to be an effective method for isolating the species of *Cronobacter sakazakii* from infant milk powder samples..

This species has the following characteristics: Gram - negative bacilli, oxidase -, catalase +, glucose +, mannose +, H₂S -, urease -, indole-, TDA -, unable to reduce nitrates to nitrites, VP - mannitol +, it is mobile at 39°C, ONPG+, ADH+, ODC – and use citrate as the only source of carbon.

The strains of *Cronobacter sakazakii* have antibiotic resistance vis-à-vis ampicillin and imipenem, however it is susceptible to gentamycin, amikacin, chloramphenicol, tetracycline and ciprofloxacin.

Key words: *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter sakazakii* species, isolation, enrichment, infant milk

المخلص

يعتبر حليب الأطفال بشكل عام منتجًا ذا جودة ميكروبيولوجية جيدة، في حالة عدم فساده. ومع ذلك، يمكن للعوامل الميكروبية أن تساهم في تغيير خصائصها مما يقلل من مدة صلاحيتها وبالتالي يتعرض لخطر التلف، فيحتمل أن يكون ناقل للنوع المرض *Cronobacter sakazakii* التي يمكن أن تتسبب في تسمم المستهلكين.

الهدف من هذا العمل هو العزل والوصف المورفولوجي والكيميائي الحيوي وكذلك تحديد مقاومة المضادات الحيوية للنوع

Cronobacter sakazakii (سابقا *Enterobacter sakazakii*). ينتمي جنس *Cronobacter* إلى عائلة

Enterobacteriaceae و هي تشمل عشرة أنواع، كل هذه الأنواع باستثناء *C. condimenti*، ترتبط بأمراض بشرية ويمكن

أن تؤدي إلى مجموعة من الأمراض المعدية، تشمل التهابات المسالك البولية والتهاب الملتحمة (الرمد) والالتهاب الرئوي.

نظرا للأزمة الصحية التي نمر بها بسبب COVID19، كانت دراستنا مستوحاة من النتائج التي تم الحصول عليها من

المؤلفات، والتي تظهر أن الإثراء في ماء البيبتون عند +4 درجة مئوية والعزل في وسط Mac Conkey عند 37 درجة مئوية لمدة

18 إلى 24 ساعة، و التي أثبتت أنها طريقة فعالة لعزل النوع *Cronobacter sakazakii* من عينات مسحوق حليب الأطفال.

يحتوي هذا النوع على الخصائص التالية: عصيات سالبة Gram، - Oxydase، + Catalase، + Glucose، + Mannose،

+ H₂S، - Uréease، + Indole، + TDA، + VP، + Mannitol، فهو غير قادر على تحويل النترات إلى نيتريت، إنه

متحرك عند 39 درجة مئوية + ONPG، + ADH، - ODC ويستخدم Citrate كمصدر وحيد للكربون.

تظهر سلالات *Cronobacter skazakii* مقاومة للمضادات الحيوية الأمبيسيلين والإيميبينيم. و من الجيد فهي حساسة

للجنتاميسين والأميكاسين والكلورامفينيكول والتتراسيكلين والسيبروفلوكساسين.

الكلمات المفتاحية: *Enterobacteriaceae*، العزلة، الإثراء، النوع *Cronobacter sakazakii*، حليب الأطفال.

Liste des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux.....	iii
Liste des figures.....	iv
Introduction.....	01

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Le lait infantile

1. Définition du lait infantile.....	03
2. Historique.....	03
3. Composition générale du lait infantile.....	04
3.1. Les protéines	05
3.2. Les glucides.....	06
3.3. Les lipides.....	06
3.4. Les vitamines.....	07
3.5. Les minéraux.....	07
3.6. Les ajouts.....	08
3.6.1. Prébiotiques / Probiotiques.....	08
4. La microbiologie du lait infantile.....	08
5. Les maladies causées par les différentes catégories de bactéries	09
6. Le lait maternel et lait infantile	10
7. Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires	11

Chapitre 02 : Le genre *Cronobacter*

1. Historique.....	12
2. Définition.....	14
3. Classification.....	14
4. Habitat.....	15
5. Voies de transmission.....	15
6. Les caractéristiques culturaux.....	16

7. La pathogénicité.....	16
8. Les caractéristiques biochimiques de <i>Cronobacter spp</i>	16
9. Les espèces de <i>Cronobacter spp</i>	17
10. La pathogénicité des espèces.....	19

Chapitre 3 :*Cronobacter sakazakii*

1. Historique.....	21
2. Définition.....	21
3. Les caractères biochimiques de <i>Cronobacter sakazakii</i>	22
4. Les caractères cultureux.....	23
5. Milieux de culture.....	23
5.1. Les milieux solides.....	23
5.1.1. La gélose de Mac Conkey.....	23
5.1.2. La gélose au Désoxycholate.....	23
5.1.3. La gélose VRBG.....	23
5.1.4. La gélose ESIA.....	23
5.1.5. La gélose DFI.....	24
5.1.6. La gélose Chromocult.....	24
5.1.7. Le milieu TSA.....	24
5.2. Bouillons.....	24
5.2.1. Bouillon de Mossel.....	24
5.2.2. Bouillon de ESSB.....	24
5.2.3. Bouillon ESE.....	24
6. La résistance aux antibiotiques.....	25

Chapitre 04: Présentation de méthodes de détection et des principaux résultats des articles scientifiques portant sur la contamination du lait infantile par la bactérie *Cronobacter sakazakii*

1. Introduction	26
2. Les méthodes d'isolement et d'identification	26

3. La galerie API 20 E.....	27
4. Test de sensibilité aux antibiotiques.....	28
5. Résultats	
5.1. Résultats de l'isolement et de l'identification de <i>Cronobacter sakazakii</i>	29
5.2. Résultats de l'oxydase, la catalase et la nitrate réductase.....	31
5.3. La galerie API 20 E	31
5.4. Résultats du profil de la sensibilité aux antibiotiques.....	33
6. Discussion	
6.1. Enrichissement de <i>Cronobacter sakazakii</i>	35
6.2. Isolement	35
6.3. Identification biochimique.....	36
6.4. La sensibilité aux antibiotiques des isolats	36
Conclusion.....	37
Références bibliographiques.....	39
Annexe	

Liste des abréviations

AA : Acide arachidonique
AAE: Acides aminés essentiels
ADH : Arginine dihydrolase
ADO : Adonitol
AGE : Acides gras essentiels
AGMI: Acides gras mono insaturé
AGPI : Acides gras polyinsaturés
AMY: Amygdaline
AOAC : Association des chimistes agricoles officiels
ARA : Arabinose
CEL : Cellobiose
CIT : Citrate de Simmons
CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute
CSB : Bouillon de criblage *Cronobacter*
Cyt-ox: Cytochrome oxydase
DHA : Acide docosahexaénoïque
DFI : Délégation aux fonctionnaires internationaux
EE: Enrichissement pour entérobactéries
EPA : Acide eicosapentaénoïque
EPT : Eau péptoné tamponé
ESE: Bouillon d'enrichissement *E. sakazakii*
ESIA: Gélose d'isolement *E. sakazakii*
ESSB: Bouillon sélectif *E. sakazakii*
F-AFLP : Analyse du polymorphisme de la longueur des fragments amplifiés fluorescents
FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture
FDA : Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
GEL : Gélatinase
GLU: D-glucose
IND : Production d'indole
INO: l'inositol
ISO : Organisation internationale de normalisation
LDC : Lysine de'carboxylase

MAN: D-mannitol

MEL: Mélibiose

MH : Muller-Hinton

NCTC : National Collection of Type Cultures «Collection nationale de cultures types»

Nit I: Nitrate I

Nit II: Nitrate II

ODC : Ornithine décarboxylase;

OMS : Organisation mondiale de la santé

ONPG: Béta-galactosidase

PCR : Amplification en chaîne par polymérase

PIF : Powder infantil formula

PPPN : Préparation en poudre pour nourrissons

RAF : Raffinose

RHA: L-rhamnose

RM : Test au rouge de méthyle

SAC : Saccharose

SOR : Sorbitol

UFC : Unité formant colonie

VP : Test de Voges-Proskauer

VRBG : Gélose au Rouge violet sels biliaires et au glucose

TDA: Tryptophane désaminase

TSA: Tryptone soja agar

Urée : Hydrolyse de l'urée

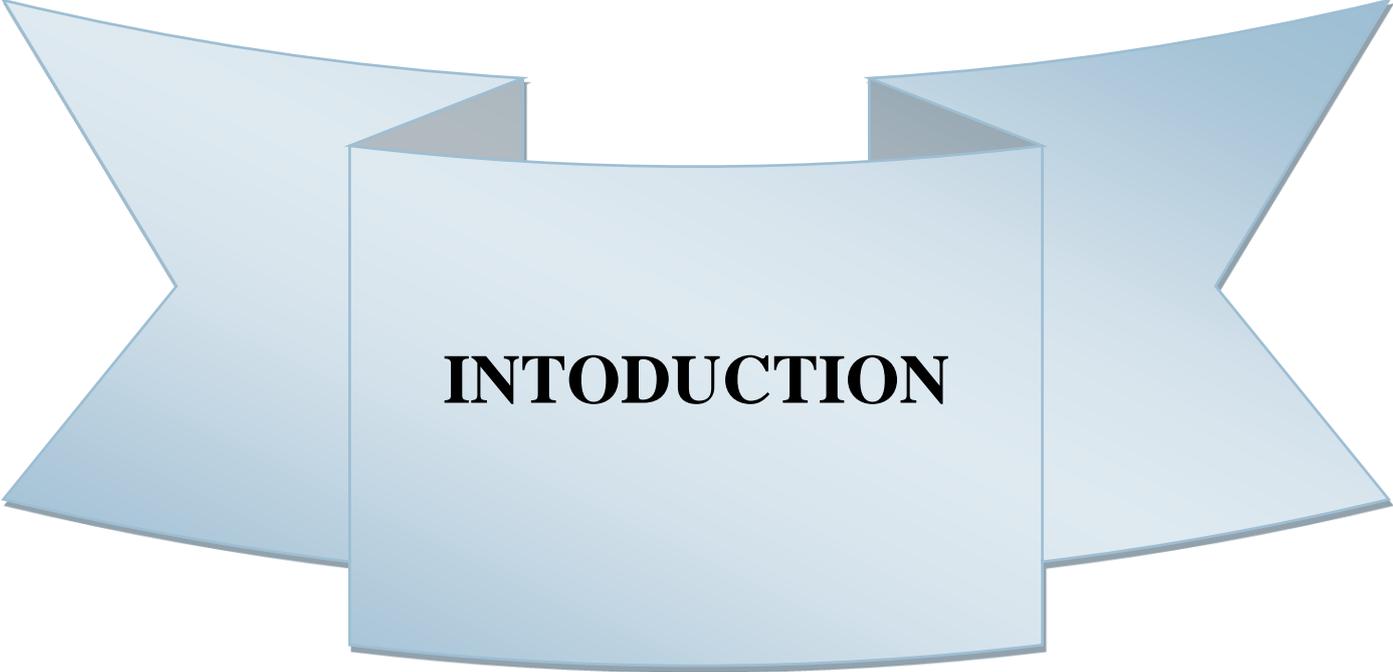
4-NP- α -Glc : 4-nitrophényl- α -D-glucoopyranoside

Liste des tableaux

Tableau 1: la composition des formules infantiles, du lait de femme et du lait de vache entier	5
Tableau 2: Les acides gras polyinsaturés (AGPI).....	6
Tableau 3: les maladies causées par les différentes catégories de bactéries	10
Tableau 4: La Composition du microbiote selon l'alimentation du nouveau-né.....	11
Tableau 5: Les critères microbiologiques applicables au lait et produits laitier.....	11
Tableau 6: La classification des principaux genres appartenant a la famille des <i>Enterobacteriaceae</i>	15
Tableau 7: Caractères biochimiques de <i>Cronobacter spp</i>	17
Tableau 8: Les espèces de <i>Cronobacter spp</i>	18
Tableau 9: Les caractères biochimiques de <i>Cronobacter sakazakii</i>	22
Tableau 10: Les résultats de l'isolement et de l'identification de <i>Cronobacter Sakazakii</i>	30
Tableau 11: Les résultats des enzymes respiratoires.....	31
Tableau 12: Résultats récapitulatifs et comparatives de trois études de la galerie Api 20 E.....	32
Tableau 13: Pourcentage de résistance aux antibiotiques de <i>C. sakazakii</i> contre 20 types d'antibiotiques selon le CLSI 2007. (n = 4)	35
Tableau 14: Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée	

Liste des figures

Figure 1: Observation microscopique de la morphologie.....	4
Figure 2: Diagramme illustrant les différentes étapes expérimentales.....	27
Figure 3: Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques.....	29
Figure 4: Photographie de l'API 20 E de l'espèce <i>Cronobacter sakazakii</i> (Bouazza S et al 2016)..	32
Figure 5: Photographie des résultats de l'API 20 E de l'espèce <i>Cronobacter sakazakii</i> . (Bushra J Albadry,2015)	33
Figure 6: Résultat de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques traduit en pourcentage.....	34
Figure 7: Galerie Api 20 E	



INTRODUCTION

Introduction

Tous les parents se soucient de la santé de leurs enfants et de leur alimentation. La meilleure source d'alimentation pour les bébés est le lait de leur mère (allaitement au sein), mais dans peu de cas, la mère ne parvient naturellement pas à satisfaire les besoins en allaitement du bébé ou même n'est pas intéressée par l'allaitement au sein, ils suivent donc les préparations pour nourrissons.

Les préparations pour nourrissons sont considérées comme le substitut du lait maternel le plus répandu au cours de la première période sensible de développement. Il fournit aux nourrissons tous les besoins nutritionnels au développement harmonieux de l'organisme humain jusqu'à ce qu'ils soient en mesure de compléter l'allaitement ou une alimentation complémentaire.

Il n'y a aucun doute que les laits pour nourrissons sont généralement considérés comme produit de bonne qualité microbiologique, sans risque d'altération, mais plusieurs facteurs peuvent contribuer à modifier ses propriétés qui réduisent sa durée de conservation et par conséquent exposées aux risques de contamination surtout les poudres lactées qui malgré leur faible teneur en eau (3 à 4%), recèlent des entérobactéries et précisément *Cronobacter sakazakii* lorsqu'elles sont préparées ou stockées dans de mauvaises conditions[1].

Par ailleurs, le lait contaminé par cette bactérie provoque des complications si on l'en fait consommer aux nourrissons qui sont beaucoup plus sensibles que les adultes aux effets des toxines. On comprend donc aisément comment la poudre du lait est un vecteur potentiel de la transmission l'espèce pathogène *Cronobacter sakazakii* qui peut occasionner des intoxications chez le consommateur [2].

L'espèce *Cronobacter sakazakii*, anciennement *Enterobacter sakazakii*, est un pathogène d'origine alimentaire qui a attiré l'attention de la communauté scientifique depuis 50 ans, s'est avéré affecter gravement les nourrissons et nouveau-nés, provoquant une septicémie, une entérocolite nécrosante et une méningite.

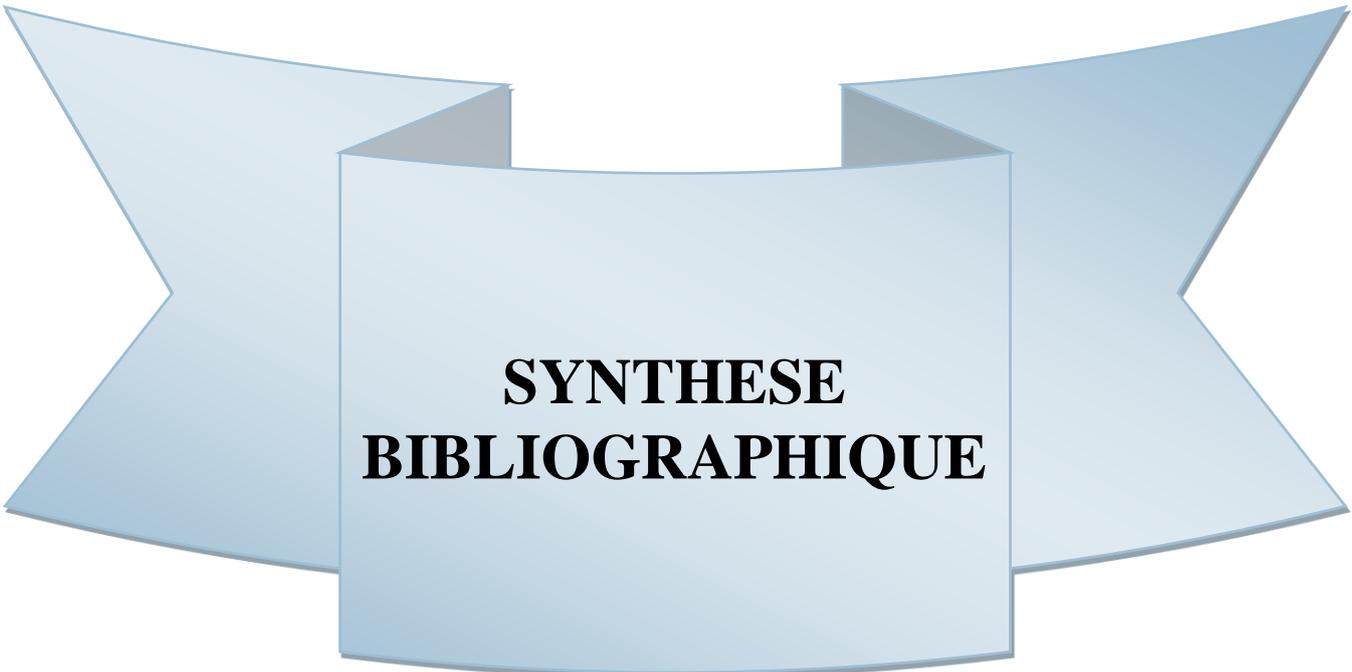
C'est un microorganisme d'origine tellurique, ubiquitaire, présent à la fois dans l'eau, le sol, les végétaux, les poussières ainsi que chez de nombreux êtres vivants : Les rongeurs et les insectes comme les mouches [3]

Cronobacter sakazakii appartient au genre *Cronobacter*, contenant dix espèces, classé dans la famille des *Enterobacteriaceae* et comme la plupart des espèces de cette famille, il est considéré comme une espèce pathogène opportuniste, sous forme bâtonnets Gram-négatif, mobile, flagelles péritriches, oxydase négative, asporulé, non acido-résistant. L'organisme à des dimensions de 0,3–1 1–6,0 mm, anaérobie facultatif, thermotolérant, ont la capacité de survivre dans les environnements avec des niveaux de pH aussi bas que trois ,bien adapté au stress sec(4).

INTRODUCTION

Dans ce contexte, nous proposons, à travers ce modeste travail de faire une étude sur le *Cronobacter sakazakii* dans les poudres de lait et de présenter les résultats inspirés de quelques articles scientifiques portant sur l'isolement et l'identification de cette bactérie ainsi que l'étude de la résistance aux antibiotiques.

Notre manuscrit comporte deux parties : en premier, une synthèse bibliographique ayant pour but de situer le travail dans son contexte scientifique, une deuxième partie présentant les différentes méthodes mises en œuvre afin de caractériser l'espèce *Cronobacter sakazakii* et les résultats obtenus, cette dernière se termine par une conclusion générale qui soulignera les perspectives de ce modeste travail.



**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**



**Chapitre 01 : Le lait
infantile**

Le lait infantile

1. Définition du lait infantile

Le lait infantile, également appelé lait maternisé :C'est un aliment complet substitut du lait maternel préparé industriellement (est un lait en poudre pour bébé), conformément aux normes applicables du codex alimentaire adapté aux nouveau-nés pour satisfaire ses besoins nutritionnel normaux, désigne tout aliment commercialisé ou présenté de toute autre manière comme produit de remplacement partiel ou total du lait maternel [2].

2. Historique

Avant l'avènement du lait en poudre, les maternités faisaient appel aux bons soins du lait d'ânesse, plus rarement de chèvre ou de brebis, afin de nourrir les orphelins ou les enfants dont les mères ne pouvaient donner de lait.

La mise au point du lait déshydraté s'est faite en plusieurs étapes :

- William Newton reçut un brevet en 1835 pour sa méthode de condensation du lait par évaporation, Ce processus a permis d'améliorer la durée de conservation par rapport au lait de vache cru .
- En 1853, l'Américain Gail Borden Jr a obtenu un brevet pour son procédé de production du lait concentré. Cette découverte est un premier pas vers la conservation du produit sans réfrigération.
- En Europe, un pharmacien suisse, Henri Nestlé, traumatisé par la perte de plusieurs de ses frères et sœurs avant leur majorité, il a cherché un moyen de lutter contre la mortalité infantile et la malnutrition des bébés.
- En 1860, il a élaboré une farine lactée, à base de lait de vache et de céréales qui sauve Wanner, un bébé prématuré. C'est un succès mondial !
- C'est en 1908 que Marcel Guigoz un suisse inventa le premier lait en poudre il utilise le procédé de dessiccation c'est à dire faisait chauffer du lait de vache sous vide et à basse température une fois reconstitué, ce lait garder toutes ses qualités nutritionnelles et ses vitamines.
- ce lait était nommé crémo, et connus un grand succès en France .il sera appelé Guigoz quelque année plus tard et sera en vente dans les boulangeries et les officines de suisse.
- 1927, il arrivera dans la pharmacie française sous la forme de boîtes métalliques de 500 grammes.
- De nombreux laboratoires ont succédé à Nestlé et Guigoz : Alma (aujourd'hui appelé blédilait), Gallia, un laboratoire spécialisé dans le lait infantile entre aussi en scène.
- Après, le lait en poudre connu la gloire à la suite de la seconde guerre mondiale puisque le taux de natalité était très élevé, c'est l'âge d'or du lait en poudre.
- Depuis 1974, il existe des laits maternisés 1er âge (0 à 6 mois) et 2ème âge (6 mois à 1 an).Plusieurs laits diététiques arrivent en pharmacie (boîtes de 900 g).

- Dès 1976, et surtout à partir de 1991, la fabrication du lait infantile est de plus en plus réglementée.
- En quelques décennies, les techniques se perfectionnent et l'usage du lait maternisé se généralise.
- En juin 2012, l'organisation internationale de normalisation (ISO) et l'AOAC ont signé un accord de coopération sur les normes internationales relatives au commerce des préparations pour nourrissons. [1] et [5].

3. Composition générale du lait infantile

Le lait infantile, c'est d'abord du lait de vache (dans l'immense majorité des cas), c'est un lait qui convient à un animal ayant un système digestif très différent de l'homme, c'est pourquoi, sous sa forme brute, il n'est pas adapté au bébé humain et doit être transformé pour se rapprocher le plus possible du lait maternel.

La composition des protéines du lait maternel est différente de celle du lait de vache.

Alors que celle de la vache est composée à 80% de caséine et à 20% de lactosérum, celui du lait maternel au contraire, ne se compose que de 40% de caséine et 60% de lactosérum, il contient aussi trop de graisses saturées et pas assez de lactose.

Il manque de vitamines et de fer, mais contient trop de sodium et de calcium, autres différences étant l'absence d'anticorps et d'autres produits comme la choline (développement cérébral du nourrisson).

Pour obtenir le lait infantile le plus proche en sa composition du lait maternel, le lait de vache est écrémé, pasteurisé, enrichi en lactose, en glucose, en vitamines et en acides aminés. On y incorpore également des graisses végétales et des émulsifiants.

On mélange le tout, on le sèche et on obtient le lait infantile.

A partir de 1998, certains laits sont enrichis en probiotiques, en 2002 en fibres (prébiotiques) qui aident le système digestif du bébé à se mettre en place. [1]

La composition des formules infantile, du lait de la femme et du lait de vache entier est représentée dans le tableau 01.

Tableau 1: La composition des formules infantiles, du lait de femme et du lait de vache entier [1].

	Préparation pour nourrisson	Lait de femme (lait maternel)	Lait de vache entier
Energie (kcal/100mL)	60-75	67	65
Protéines (g/100mL)	1,2-1,8	1,1	3,7
Caséines	30%-80%	40 %	80 %
Protéines solubles	20%-70%	60 %	20 %
Lipides (g/100mL)	3,1-3,8	3,9	3,4
Acide linoléique (mg)	500	350	80
Glucides (g/100mL)	7	6,8	4,5
Lactose	75%	85 %	100 %
Fer (mg/100mL)	0,5-1,5	0,06	0,05
Ca (mg/100mL)	46-93	33	125

3.1. Les protéines

Sont indispensables notamment à la construction, entretien et réparation de tous les tissus du corps humain.

Les protéines des laits infantiles sont apportées en quantités suffisantes, correspondant à la juste dose pour répondre aux besoins de croissance et aux capacités métaboliques de l'enfant (un excès peut entraîner une surcharge rénale et une dérégulation métabolique).

La qualité des protéines est également importante car elles apportent des acides aminés essentiels(AAE) ex. : la tyrosine, la cystine, l'histidine, la cystéine et la taurineQui doivent être présents en quantité au moins égale à celle du lait maternel.

Les besoins en protéines sont assez constants : Environ 7 g/jour jusqu'à 9 mois, 8g/jour jusqu'à 24 mois, et 9,5 g/jour jusqu'à 3 ans.

Il est conseillé que l'enfant consomme de 10g par jour de protéines .elles sont divisées en deux grands groupes : les caséines et les protéines solubles.

- Les caséines

Représentent 40% des protéines dans le lait maternel. Elles sont sous forme de micelles et coagulent lorsque l'on ajoute de la présure ou des bactéries lactiques .elles sont insolubles et forment

des gros flocons dans l'estomac du nourrisson, ce qui ralentit la vidange gastrique et donne un effet de satiété au nourrisson .en excès, elles favorisent la constipation.

- **Les protéines solubles**

Représentent 60%des protéines du lait maternel et ne coagulent pas entre-elles lors dès l'ajout de présure. Elles sont constituées principalement d'albumine et de lactoglobulines.

Elles sont plus adaptées aux capacités physiologiques du nourrisson (assurent une meilleure digestibilité du lait et de selles plus molles).

3.2. Les glucides

Source essentiels d'énergie pour le nourrisson, La fraction glucidique qui compose la majorité des laits infantiles est le lactose et dextrine maltose.

- **Le lactose** : Principal sucre du lait, il stimule la fermentation, accélère le transit et augmente le risque de coliques. Il est indispensable pour la synthèse des galactoses cérébrosides du cerveau et au développement musculaire.

- **Autres sucres (les sucres complexes)** : Ont un pouvoir immunologique très important du fait de l'immaturité immunologique : dextrine maltose (diminue la fermentation, les ballonnements et donc conseillé pour les coliques du nourrisson), ainsi que l'amidon, et le fructose.

3.3. Les lipides

Sont d'origine végétale ou animale, à un rôle important :

-**Une source essentielle d'énergie** : 45 à 50% de l'énergie est apportée sous forme de lipides par les préparations lactées pour nourrissons.

-**Une source majeure d'acides gras essentiels (AGE)** : nécessaires au développement cérébral et à la maturation des fonctions neurosensorielles.

-**Acides gras polyinsaturés (AGPI)**

Les différents acides gras Polyinsaturés (AGPI) sont représentés dans le tableau 02 ci-dessous

Tableau 2: Les acides gras polyinsaturés (AGPI) [2].

Famille des « Oméga 6 »	Famille des « Oméga 3 »
Acide linoléique (C18:2 n-6) - AGPI longue chaîne n-6 dont ARA (ARA) : (C20:4 n-6)	Acide alpha-linolénique (C18 :3 n-3) AGPI longue chaîne n-3 dont EPA et DHA (EPA) : (20:5 n -3) (DHA) : (22:6 n - 3)

Acides gras monoinsaturés (AGMI) : Acide érucique.

AG saturés : Acide laurique et Acide myristique.

AG trans

3.4. Les vitamines

- **Vitamine A :** Un apport habituel 108 à 257 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ de vitamine a qui permet de maintenir des concentrations sériques normales.

- **Vitamine E :** Le contenu en vitamine E est de 1.2 à 2.4 mg/g d'acide linoléique dans les préparations pour nourrisson.

- **Vitamine D :** Doivent être assurés dès la naissance afin de diminuer le risque d'hypocalcémie néonatale précoce ou tardive, l'apport recommandée est de l'ordre 400 à 800 VI/j.

- **Vitamine K :** Les préparations pour nourrissons enrichies en vitamine K (2.6 à 7.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$), il contribué à la prévention de la maladie hémorragique du nourrisson.

- **Vitamine C :** Des préparations pour nourrissons et variable, mais quoi qu'il en soit, les besoins de l'enfant né à terme de 35 mg/j, sont couverts sans difficulté.

- **Vitamine B1 :** Les apports recommandés sont de 300 $\mu\text{g}/\text{j}$.

- **Vitamine B2 :** Les apports recommandés sont de 400 $\mu\text{g}/\text{j}$.

- **Vitamine B12 :** Un apport de 0.5 $\mu\text{g}/\text{j}$ est recommandé.

- **Acide folique :** Très variable un apport de 30 $\mu\text{g}/\text{j}$ conseillés.

- **Niotine :** Nécessaire au nourrisson est de 35 $\mu\text{g}/\text{j}$.

- **Niacine (vitamine pp) ou la vitamine B3 :** Nécessaire au nourrisson est de 6mg/c'est une vitamine hydrosoluble. Elle ne peut être stockée dans les gras ainsi que participe à plus de 200 réactions enzymatiques. Elle joue un rôle dans: la formation des globules rouges, Le transport de l'oxygène vers les cellules, La circulation sanguine et Le fonctionnement du système digestif [6]

3.5. Les minéraux

- **Sélénium :** 10 à 15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{j}$ nécessaires pour assurer une protection contre les radicaux libres.

- **Iode :** Leur rôle est son intégration aux hormones thyroïdiennes. L'apport recommandé de $\mu\text{g}/100\text{kcal}$ de la naissance à 12 mois.

- **Fer** : Les apports recommandés sont 8 à 10 mg/kg/j. Le fer est nécessaire à la formation de l'hémoglobine et de la myoglobine. Il a un rôle dans l'immunité et les fonctions cérébrales.
- **Zinc** : Sont proches de ceux de fer de 5 à 10 mg/ kg/j.
- **Calcium** : Les apports recommandés (400 à 600 mg/kg/ j) elle joue un rôle dans le renforcement des os.
- **Le magnésium** : À un rôle d'activateur enzymatique. Il maintient l'ion potassium dans la cellule et est nécessaire aux processus de défense de l'organisme. [2]

3.6. Les ajouts

Pour favoriser la digestion des nourrissons et conférer à l'enfant nourri avec ces laits un écosystème intestinal proche de celui des enfants nourris au sein. [7]

3.6.1. Prébiotiques / Probiotiques

- **Prébiotique**: Substance non digestible qui stimule la croissance ou l'activité de la flore colique.
- **Probiotique**: Microorganisme vivant qui s'implante dans le tube digestif.
- **Ferments lactiques**: Induisent une fermentation du lactose, diminution des coliques. [2]

4. la microbiologie du lait infantile

Les préparations pour nourrissons sont considérées comme le substitut du lait maternel le plus répandu au cours de la première période sensible de développement. Il fournit aux nourrissons tous les besoins nutritionnels jusqu'à ce qu'ils soient en mesure de compléter l'allaitement ou une alimentation complémentaire.

Il n'y a aucun doute que les laits pour nourrissons sont généralement considérés comme produit de bonne qualité microbiologique, sans risque d'altération, mais plusieurs facteurs peuvent contribuer à modifier ses propriétés qui réduisent sa durée de conservation et donc sa valeur commerciale.

Les préparations pour nourrissons peuvent être contaminées lors de la préparation, des procédures de reconstitution ou lors de leur transport et leur stockage.

Les nouveau-nés sont considérés comme faisant partie du groupe d'individus à haut risque, car leur système immunitaire n'est pas encore complètement développé et peut donc être facilement infecté par des microbes. Par conséquent, il est raisonnable que les produits utilisés soient plus sûrs que les aliments pour adultes ayant développé plusieurs mécanismes de défense contre les infections. Bien que les micro-organismes présents ne puissent pas se développer en raison de sa faible teneur

en humidité, leur présence est d'une grande importance et sert d'indice des normes d'hygiène maintenues pendant la production, traitement et manutention.

Le lait infantile fournit un substrat hautement nutritif, qui laisse croître des bactéries ainsi que les levures et les moisissures.

Les différents traitements technologiques, subits par le produit avant séchage, conditionnent la qualité microbiologique de la poudre. Au cours du séchage, une partie de la flore initialement présente dans le produit est détruite et une autre partie est inactivée par le stress thermique.[1]

4.1. Les bactéries d'altération

La microflore dépend du nombre et du type de bactéries présentes dans le lait cru, la température de préchauffage et les conditions de fonctionnement de l'évaporateur. Un grand nombre de microorganismes dans le lait cru peut se retrouver dans la poudre.

4.2. Les bactéries pathogènes

Elles ont un intérêt majeur et comprennent des *salmonella*, *Bacillus*, *Staphylococcus* et *Escherichia coli*. Alors que ces organismes ne se développent pas dans la poudre, ils restent nombreux pour de longues périodes et peuvent se développer lorsque la poudre est reconstituée et conservée à température favorable. Les principaux groupes sont :

a) **Microcoques**: Thermorésistants et difficiles à éliminer complètement du matériel et des installations laitières.

b) **Streptocoques thermorésistants**: Il s'agit de : *S. thermophilus*, *S. bovis*, *S. faecalis*, *S. liquefaciens*. Les conditions de l'installation favorisent leur prolifération et donnent naissance à de graves infections.

c) **Corynebactéries**: Dont la fréquence est très variable. Les souches thermorésistantes proviennent des approvisionnements laitiers.

d) **Les spores bactériennes** (*B. subtilis* et *B. licheniformis*) : Se trouvent dans presque toutes les poudres, à moins qu'elles aient subi un traitement à très haute température.

e) **Des contaminants divers** : Eventuellement non thermorésistants, qui peuvent provenir d'une contamination atmosphérique ou d'un contact direct. [1]

5. Les maladies causées par les différentes catégories de bactéries

Les microorganismes ou les toxines microbiennes indésirables présentes dans les préparations en

poudre pour nourrissons et la force probante d'un lien de causalité entre leur présence dans ces préparations et la maladie de certains nourrissons, ont été classés dans le tableau 3.

Tableau 3: Les maladies causées par les différentes catégories de bactéries. [8]

Les catégories des organismes	Les bactéries	Causalité
Organismes de catégorie "A"	<i>Enterobacter sakazakii</i> et <i>Salmonella enterica</i>	Causalité clairement établie de maladie chez les nourrissons
Organismes de catégorie "B"	<i>Pantoea agglomerans</i> et <i>Escherichia vulneris</i> (connues sous le nom de <i>Enterobacter agglomerans</i>), <i>Hafnia alvei</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Citrobacter koseri</i> , <i>C. freundii</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> et <i>Enterobacter cloacae</i> .	Causalité plausible, mais non encore établie de maladie chez les nourrissons
Organismes de catégorie "C"	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Cl. perfringens</i> , <i>Cl. botulinum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Listeria monocytogenes</i> .	Causalité plausible, mais non encore établie de maladie chez les nourrissons

6. Lait maternel et lait infantile

Des études se sont intéressées à la différence de composition du microbiote intestinal de nourrissons nourris au lait maternel ou avec des préparations infantiles.

Les enfants nourris au lait infantile développent une microflore plus complexe avec une baisse l'abondance des *Bifidobactéries* qui dominent toujours mais à 40% seulement, avec des bactéries anaérobies strictes telles que *Bacteroides*, *Clostridium* et *Staphylococcus*. Les bactéries aérobies sont présentes en plus grand nombre chez ces enfants nourris au lait infantile.

Le lait maternel, contrairement au lait de vache, est très riche en lactose. Le lactose entraîne une forte production d'acide lactique grâce au métabolisme microbien, ce milieu acide va favoriser la croissance des *Bifidobactérium* et *Lactobacillus*. Les oligosaccharides (prébiotiques) du lait maternel sont également bifidogènes.

Le lait maternel est de plus naturellement riche en bactéries commensales telles que des *Staphylocoques*, *Streptocoques* et *Bifidobactéries*. [7] et [9]

La Composition du microbiote selon l'alimentation du nouveau-né est représentée dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4: La Composition du microbiote selon l'alimentation du nouveau-né. [7]

Lait maternel	Lait infantile
Bifidobactéries +++	Bifidobactéries ++
Lactobacillus +++	Bacteroïdes +
Bacteroïdes +	Clostridium +
	Staphylocoques +

7. Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires (lait et produits laitiers)

Les critères microbiologiques applicables aux laits et produits laitiers sont représentés dans le tableau 5.

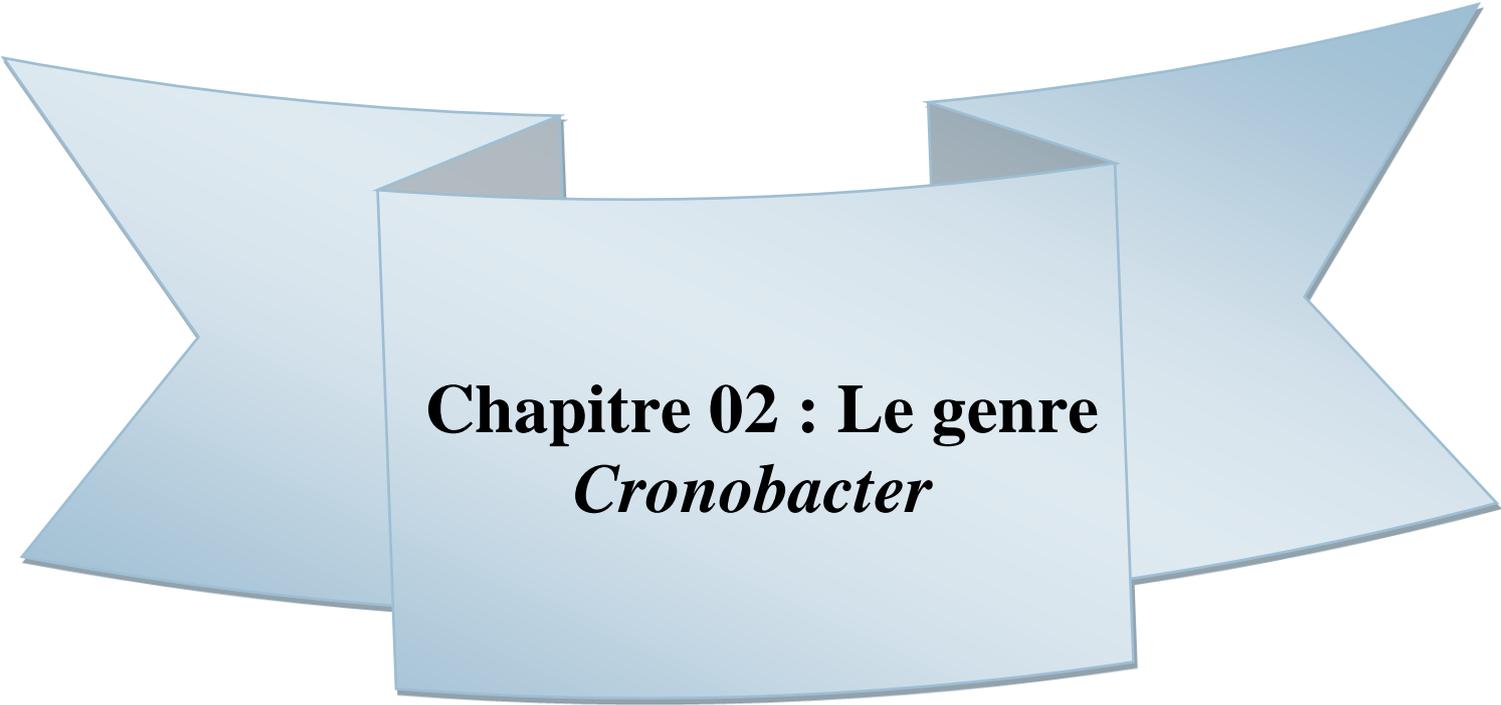
Tableau 5: Les critères microbiologiques applicables aux laits et produits laitiers. [10]

Catégories des denrées Alimentaire	Micro-organismes/ Métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (UFC(1)/g ou UFC/ml)	
		N	c	M	M
Lait en poudre	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	10	10 ²
		5	2	10	10 ²
Lactosérum en poudre	<i>Staphylocoques</i> à <i>Coagulase</i> +	5	2	10	10 ²

N : nombre d'unités constituant l'échantillon.

M : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable

c : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.



Chapitre 02 : Le genre
Cronobacter

Le genre *Cronobacter*

1. Historique

Cronobacter fait partie de la famille des entérobactéries. Il a été décrit pour la première fois comme "*Enterobacter cloacae* pigmenté jaune».

En 1950 : Une souche d'*Enterobacteriaceae* est isolée d'une «boîte de lait séché» et envoyée à NCTC en Angleterre. Là, il a reçu la désignation NCTC 8155. Il a été caractérisé à la fin des années 1970 et identifié comme le biogroupe *Enterobacter sakazakii* 1. Il s'agit de la date la plus ancienne pour une souche de cet organisme et c'est également le premier isolat documenté de *Cronobacter* provenant d'aliments et d'un produit de type «lait séché». En 2011, Joseph et Forsyth ont rapporté des résultats supplémentaires pour cette souche, qu'ils avaient obtenue puis étudié environ 60 ans après sa première isolation. Ils ont déterminé que c'était « *Cronobacter sakazakii* type de séquence 4 », qu'ils ont trouvé être « un clone très stable avec une forte propension à la méningite néonatale ». [11]

En 1953 : Une souche de pus abdominal a été soumise au NCTC et a reçu la désignation NCTC 9238. Elle a ensuite été identifiée comme le biogroupe *E. sakazakii* 1. Il s'agit de la date la plus ancienne d'un isolat de *Cronobacter* provenant d'un échantillon clinique humain.

En 1980 : Le nom *Enterobacter sakazakii* a été «officiellement publié» selon les règles du Code bactériologique et ainsi le nom est devenu une espèce validement publiée qui peut s'écrire *Enterobacter sakazakii*. La description de l'espèce comprenait 15 sous-groupes, qui ont été classés et nommés comme 15 biogroupes distincts. Le biogroupe 15 était très différent dans ses propriétés biochimiques des 14 autres biogroupes. Nous avons supposé que ce biogroupe inhabituel pourrait éventuellement être classé comme une espèce distincte, ce qui était effectivement le cas 27 ans plus tard.

En 2001: Il y a eu une épidémie d'*Enterobacter sakazakii* dans un hôpital du Tennessee avec un cas de méningite et huit autres cas de colonisation par *Enterobacter sakazakii*. Il a été causé lorsque les nourrissons ont été nourris avec Portagen, une préparation commerciale en poudre produite par Mead Johnson. Cette épidémie a marqué le début de l'intérêt de la Food and Drug Administration des États-Unis pour la contamination des préparations en poudre pour nourrissons et en particulier la contamination par *Enterobacter sakazakii*.

En 11 avril 2002 : En réponse à l'épidémie de Portagen, la Food and Drug Administration américaine a envoyé une lettre à la communauté sanitaire américaine: «Health Professionals Letter on *Enterobacter sakazakii* Infections Associated with Use of Powdered (Dry) Infant Formulas in Neonatal Intensive Care Units. [11]

En 26 juillet 2002 : En réponse à l'épidémie de Portagen, la FDA des États-Unis a lancé un programme visant à déterminer le degré de contamination par *E. sakazakii* des préparations en poudre pour nourrissons (et des ingrédients bruts associés) fabriqués par des entreprises américaines. Cette étude de la FDA a déterminé que 5 des 22 (22,7%) des échantillons groupés de «produit fini» étaient contaminés par *E. sakazakii*. Deux des 69 échantillons de matières premières étaient contaminés par *E. sakazakii*.

En 18-19 mars 2003 : Dans le cadre de nouvelles réponses à l'épidémie de Portagen, le Comité consultatif sur l'alimentation de la Administration des aliments et des médicaments des États-Unis a tenu une réunion d'experts pour discuter des infections à *E. sakazakii* chez les bébés et les nourrissons en mettant l'accent sur la contamination des préparations en poudre pour nourrissons. Par des entreprises américaines. Lors de la réunion, le Dr Don Zink a présenté les résultats de l'échantillonnage et des tests de la FDA pour *E. sakazakii*.

En 2004 : L'Organisation mondiale de la santé a publié le premier des trois livres sur *Cronobacter / Enterobacter sakazakii*. [11]

En 2006 : L'OMS a publié le deuxième des trois livres sur *Cronobacter / Enterobacter sakazakii*.

En 2007 : *Cronobacter* a été proposé comme nouveau genre pour inclure les organismes anciennement classés comme *Enterobacter sakazakii*. *Cronobacter* avait huit organismes différents, dont quatre espèces nommées, une espèce sans nom et cinq sous-espèces nommées:

Cronobacter sakazakii, *Cronobacter sakazakii* sous-espèce *sakazakii*, *Cronobacter sakazakii* sous-espèce *malonaticus*, *Cronobacter dublinensis*, *Cronobacter dublinensis* sous-espèce *dublinensis*, *Cronobacter dublinensis* sous-espèce *lactaridi*, *Cronobacter dublinensis* sous-espèce *lausanensis*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter* génomospécies 1 (une espèce distincte, mais sans nom).

En 2008 : L'Organisation mondiale de la santé a publié le troisième des trois livres sur *Cronobacter / Enterobacter sakazakii*. Le livre *Enterobacter sakazakii* a été publié par l'American Society for Microbiology dans sa série Emerging Issues in Food Safety.

En 22-23 janvier 2009 : La première conférence internationale sur *Cronobacter (Enterobacter sakazakii)* a eu lieu à O'Reilly Hall, University College, Dublin, Irlande1.

Lors de cette conférence, le Dr Angelica Lehner a rapporté qu' *Enterobacter sakazakii* peut être dans un état viable mais non cultivable et ainsi échapper à la détection lorsque seules des méthodes de culture microbiologiques «normales» sont utilisées.

En 2012-13: Trois nouvelles espèces de *Cronobacter* ont été décrites - *Cronobacter universalis*, *Cronobacter pulveris* et *Cronobacter zurichensis*. [11]

En 2015 : Dix espèces et trois sous-espèces de *Cronobacter* ont maintenant été nommées, décrites et sont inscrites dans la nomenclature:

Cronobacter condimenti. *Cronobacter dublinensis*. *Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis*.
Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi. *Cronobacter dublinensis subsp. lausannensis*.
Cronobacter helveticus. *Cronobacter malonaticus*. *Cronobacter muytjensii*. *Cronobacter pulveris*.
Cronobacter sakazakii . *Cronobacter turicensis* . *Cronobacter universalis*. *Cronobacter zurichensis*.
[11]

2. Définition *Cronobacter spp*

Le *Cronobacter spp* est un membre de la famille des *Enterobacteriaceae*, responsables d'infections humaines, sont des bacilles a gram négatif, mobile (le plus souvent flagellé péri triches) ou non .cellules isolés ou par paires, anaérobies facultatifs, aspérules, thermo tolérants se développe de 6°C à 45°C. L'organisme présente une plus grande tolérance aux acides avec une croissance à pH 4,5 montrée par de nombreuses souches, et certaines souches sont capables de croître à pH 3,9. [11], [12] et [13]

Leur capacité à former des biofilms, leur relative résistance au stress osmotique et à La dessiccation à faible activité de l'eau que les autres membres des *Enterobacteriaceae*. [12]

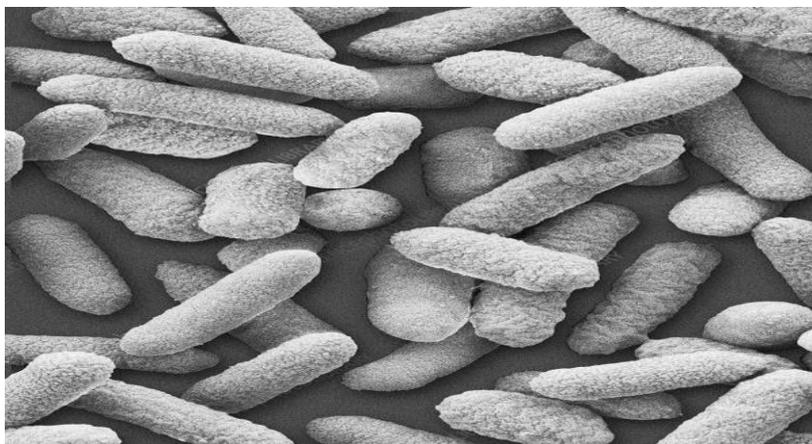


Figure 1 : Observation microscopique de la morphologie de *Cronobacter sakazakii*. [14]

3. Classification

La classification du principal genre appartenant à la famille des entérobactéries est représentée dans le tableau 06

Tableau 6 : la classification des principaux genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*.

[15]

Domaine	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Classe	Gamma-proteobacteria
Ordre	Enterobacteriales
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genres :	<i>Biostraticola</i> , <i>Buttiauxella</i> , <i>Calymmatobacterium</i> , <i>Cedecea</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Cronobacter</i> , <i>Enterobacillus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Franconibacter</i> , <i>Gibbsiella</i> , <i>Izhakiella</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Kosakonia</i> , <i>Koserella</i> , <i>Leclercia</i> , <i>Lelliottia</i> , <i>Metakosakonia</i> , <i>Moranella</i> , <i>Phytobacter</i> , <i>Pluralibacter</i> , <i>Pseudeschherichia</i> , <i>Pseudocitrobacter</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Rosenbergiella</i> , <i>Saccharobacter</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Shimwellia</i> , <i>Siccibacter</i> , <i>Trabulsiella</i> , <i>Yokenella</i> , <i>Yerssinia</i>

4. Habitat

Cronobacter est un micro-organisme d'origine tellurique, ubiquitaire, présent à la fois dans l'eau, le sol, les végétaux, les poussières ainsi que chez de nombreux êtres vivants. Les rongeurs et les insectes comme les mouches, peuvent être des vecteurs de contamination. [8]

Cronobacter a été isolé de nombreux aliments d'origine végétale ou animale, tant déshydratés, fumés, congelés, fermentés, que crus ou cuits. Comme le bœuf haché, les saucisses, le fromage et les légumes, y compris les légumes à salade, mais plus particulièrement dans les aliments à faible activité en eau tels que le lait en poudre séché, les viandes séchées, les légumineuses, les noix, les céréales, pâte à pain, farines séchées, herbes et épices et autres aliments secs [13].

5. Voies de transmission

La transmission à l'Homme s'effectue exclusivement par voie alimentaire. La transmission directe entre Hommes n'a pas été démontrée. Le portage sain et la part des infections nosocomiales sont encore mal connus.

La formation de biofilms confère à l'organisme une plus grande résistance aux désinfectants et a été suggérée comme un facteur important de transmission. [12].

6. Les caractères cultureux

Les colonies ont un diamètre de 2 à 3 mm et peuvent prendre plusieurs aspects : Colonies lisses typiques, faciles à détacher du milieu, colonies mucoïdes caoutchouteuses et, parfois, colonies sèches, difficiles à détacher de la gélose. Ces types de colonies apparaissent selon le type de milieu utilisé et selon les souches présentes. La production d'un pigment jaune non diffusible, de type caroténoïde, est observée lorsque les bactéries se développent sur une gélose non sélective comme la gélose trypticase de soja, à température ambiante et sous lumière naturelle [13].

7. La pathogénicité

Cronobacter est l'agent d'infections opportuniste rares mais sévères touchant particulièrement les très jeunes enfants lorsqu'il se trouve dans les préparations en poudre pour les nourrissons où 3 UFC/100 g poudre suffit pour que des infections se produisent.

Les personnes âgées et les sujets immunodéprimés, ces infections étant beaucoup plus souvent identifiées chez les prématurés que chez les adultes. [16], [17].

La pathogénicité est le résultat de l'ingestion de cellules vivantes qui se fixent et envahissent l'intestin et pénètrent dans le système circulatoire (bactériémie ou septicémie). L'entérocolite nécrosante peut être un résultat immédiat de l'entrée dans l'intestin chez les individus sensibles. Une fois dans le système circulatoire, un tropisme est observé vers le système nerveux central et une méningite peut en résulter. L'organisme envahit la barrière hémato-encéphalique; une fois à l'intérieur, il provoque des kystes ou des abcès, ce qui peut entraîner une hydrocéphalie (accumulation de liquide céphalorachidien) et une hypertrophie des ventricules. Cela peut entraîner des lésions cérébrales et une altération à long terme de la vue, de l'ouïe et des mouvements. Les nouveau-nés (<4 semaines) sont le groupe le plus à risque, en particulier ceux de faible poids à la naissance, mais des cas ont été observés chez des enfants jusqu'à 3 ans. Bien que l'incidence signalée soit très faible, c'est le taux de mortalité élevé (40 à 80%). et peut causer aussi des infections rares de la circulation sanguine et du système nerveux central. Elle a été associée à une infection intestinale grave et à un empoisonnement du sang, surtout chez les nouveau-nés. [18], [19]

8. Les caractéristiques biochimiques de *Cronobacter spp*

Les caractéristiques biochimiques de *Cronobacter spp* sont représentées dans le tableau.7

Tableau 7 : Caractères biochimiques de *Cronobacter spp.* [13]

Caractères biochimiques	Réactions
H ₂ S	-
ADO	-
ARA	+
CEL	+
RAF	+
SAC	+
SOR	-
ADH	+
CIT	+
LDC	-
4-NP- α -Glc	+
MR	-
ODC	+
VP	+

- Réaction positive : +
- Réaction négative : -

9. Les espèces de *Cronobacter spp*

Le genre *Cronobacter* est constitué de 10 espèces qui sont représenté dans le tableau 08.

Tableau 8: les espèces de *Cronobacter spp* [20]

Espèces de <i>Cronobacter</i>	Biogroupes	Définition
<i>Cronobacter sakazakii</i>		Voir le chapitre : 03
<i>Cronobacter malonaticus</i>	5, 9 et 14	<i>Cronobacter malonaticus</i> : Positif pour l'utilisation de malonate, La souche type, CDC 1058-77T (5LMG 23826T5DSM18702T), a été à l'origine isolée d'un abcès mammaire.
<i>Cronobacter turicensis</i>	16	<i>Cronobacter turicensis</i> : concernant Turicum, le nom latin de Zurich, comme a été isolée à Zurich, en Suisse). La souche type, z3032T (5LMG 23827T5DSM 18703T), a été isolé d'une hémoculture lors d'un cas de nouveau-né méningite survenue à Zurich en 2005
<i>Cronobacter muytjensii</i>	15	<i>Cronobacter muytjensii</i> nommé en l'honneur des Néerlandais microbiologistes Harry Muytjens, qui a effectué une grande partie de premiers travaux sur (<i>Enterobacter sakazakii</i>). La souche type, ATCC 51329T (5CIP 103581T), a été déposée à l'origine dans les deux collections par BioMérieux, La Balme-les-Grottes, France
<i>Cronobacter condimenti</i>	1	<i>Cronobacter condimenti</i> Auparavant connu sous le nom de <i>Cronobacter sp</i> . génomospécies 1. isolé de viande épicée
<i>Cronobacter universalis</i>	Séparé Génomospécies	<i>Cronobacter universalis</i> : il s'agit du premier isolat documenté eau une désignation d'espèce pour <i>Cronobacter sp</i> . génomospécies1, récupérées d'une infection des jambes, de l'eau et des ingrédients alimentaires.

Sous espèce : <i>Cronobacter dublinensis dublinensis</i> .	6 -10-12	<i>Cronobacter</i> subsp. <i>Dublinensis</i> : concernant Dublin, en Irlande, à l'origine de la souche type). La souche type, DES187T (5LMG 23823T5DSM 18705T), a été isolé d'un échantillon environnemental provenant d'une usine de fabrication de lait en poudre en 2004. La souche a également été appelée souche CFS237.
Sous espèce : <i>Cronobacter dublinensis lausannensis</i> .	10	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>Lausannensis</i> : concernant Lausanne, La Suisse, origine de la souche type pour ce sous-espèces). La souche type, E515T (5LMG 23824T5DSM 18706T), a été à l'origine isolé du bassin d'une fontaine d'eau
Sous espèce : <i>Cronobacter dublinensis lactaridi</i>	6	<i>Cronobacter dublinensis</i> subsp. <i>lactaridi</i> La souche type de cette sous-espèce, E464T (5LMG23825T5DSM 18707T), était à l'origine isolée d'une installation de production de lait en poudre en 2003.
<i>Cronobacter helveticus</i> 1.		A été mise à jouré en 2019 et prend le nom <i>Franconibacter helveticus</i>
<i>Cronobacter pulveris</i>		A été mise à jouré en 2019 et prend le nom <i>Franconibacter pulveris</i>
<i>Cronobacter zurichensis</i>		A été mise à jouré en 2019 et prend le nom <i>Siccibacter turicensis</i>

10. La pathogénicité des espèces

-*Cronobacter malonaticus* sp. Nov : est un membre du genre *Cronobacter* qui est considéré comme un pathogène opportuniste , les facteurs de virulence de *C. malonaticus*, y compris leur capacité à adhérer, à envahir et à surmonter les barrières de l'hôte, elle a pu envahir toutes les cellules humaines utilisées et survivre et se répliquer dans les microphages.

La capacité potentielle de *C. malonaticus* à provoquer des infections graves chez les nouveau-nés ou les adultes telles que l'entérocolite nécrosante, la méningite, la bactériémie, la pneumonie et l'infection des voies urinaires. [21]

- ***Cronobacter turicensis* sp. Nov:** Un pathogène d'origine alimentaire opportuniste, qui est connu comme une cause rare mais importante d'infections néonatales potentiellement mortelles.

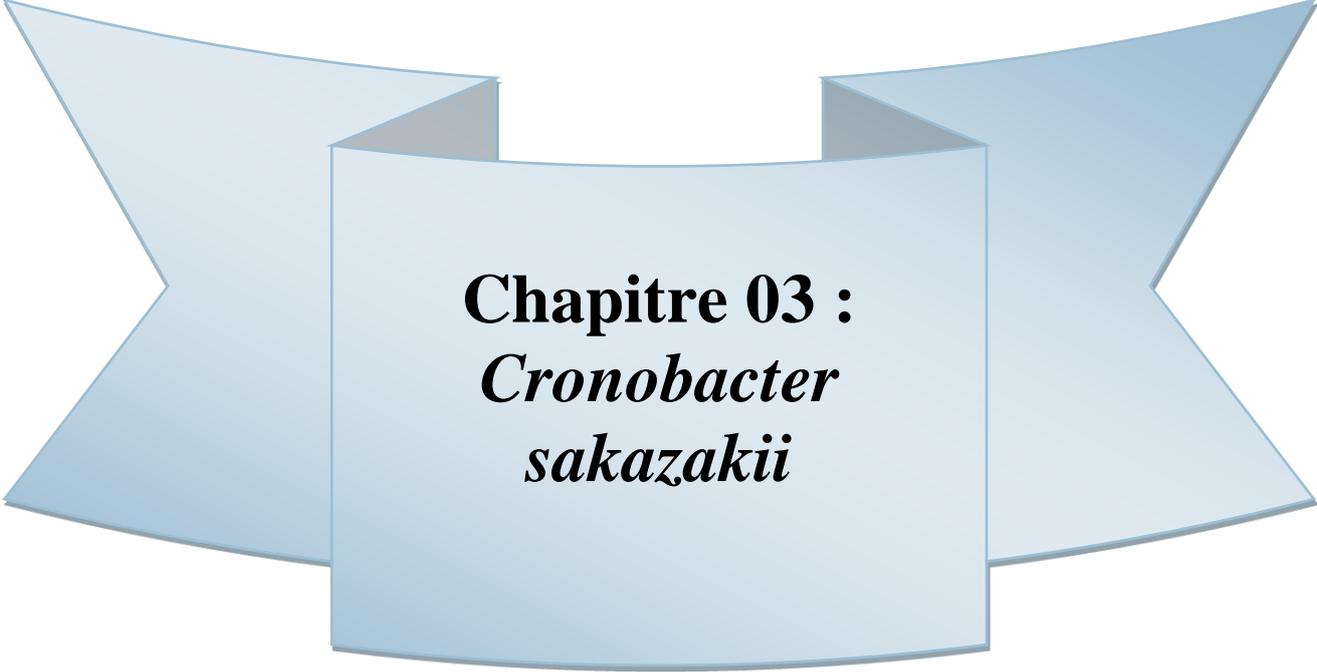
C'est une souche qui a causé la mort de septicémie chez les nouveau-nés. Suivie du développement d'une bactériémie sévère [22]

Parmi toutes les protéines de *C. turicensis*, 223 ont été annotées en tant que protéines liées à la virulence et à la maladie. [23]

- ***Cronobacter muytjensii* sp. nov :** Les *Cronobacter* sont considérés comme des pathogènes opportunistes et ont été impliqués dans les infections du nouveau-né et du nourrisson, provoquant une méningite, une entérocolite nécrosante et une bactériémie ou une septicémie. [24]

- ***Cronobacter condimenti* sp. nov. et *Cronobacter universalis* sp. Nov :** *Cronobacter condimenti* sp. nov., isolé de viande épicée, et *Cronobacter universalis* sp. nov, une désignation d'espèce pour *Cronobacter* sp. génomospécies, récupérées d'une infection des jambes, de l'eau et des ingrédients alimentaires. [25]

- ***Cronobacter dubliniensis* sp.nov :** Des études épidémiologiques ont montré que *C.dubliniensis* est répandu dans le monde entier et qu'il est principalement associé au portage oral et aux infections oropharyngées dans le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) patients atteints du syndrome d'immunodéficience infectée et acquise (SIDA). [26]



Chapitre 03 :
Cronobacter
sakazakii

Cronobacter Sakazakii

1. Historique

Cronobacter sakazakii en l'honneur du microbiologiste japonais Riichi Sakazaki a été décrit en 2007 et prend son nom.

Le nom *Cronobacter* est dérivé de manière appropriée de la mythologie grecque, il a été nommé d'après le dieu mythologique grec, Cronos. Cronos était le fils d'Uranus (Ciel).

Depuis le début, cependant, de nombreux bio groupes différents ont été définis comme *E. sakazakii*, l'existence de ces géno- et biogroupes divergents suggérant que *E. sakazakii* pourrait en fait représenter plusieurs espèces. Ainsi, en 2007, un groupe de recherche a clarifié la relation taxinomique entre les différentes souches d'*E. sakazakii*, en utilisant de nouveaux moyens sophistiqués de visualisation et d'analyse des bactéries qui repose à la biologie moléculaires (la f-AFLP, le ribotypage automatisé, le séquençage du gène de l'ARNr 16S pleine longueur et l'hybridation ADN-ADN). Iverson et al ont ainsi pu distinguer de nombreuses espèces distinctes. Leurs travaux ont abouti à la proposition d'une classification alternative d'*E. Sakazakii* dans un nouveau genre, *Cronobacter*. [20], [27] et [28]

2. Définition

Cronobacter sakazakii appelée initialement *Enterobacter sakazakii*, reclassée en 2007, après séquençage complet du gène de l'ARNr 16S, hybridation ADN-ADN et étude des réactions chimiques, dans un nouveau genre : *Cronobacter*. [29]

C'est l'espèce type du genre *Cronobacter* et représenté toujours par la souche ATCC 29544T (5NCTC 11467T) qui a été originellement isolé de la gorge d'un enfant, Comprend les bio groupes suivants : 1, 2-4, 7, 8, 11 et 13. [20]

Ce sont des bacilles, à Gram négatif appartient à la famille phylogénétique des *Enterobacteriaceae*, anaérobies facultatives, Non sporulée, encapsulés. Cette espèce se différencie des autres *Enterobacter* par son pigment jaune qui a été observée comme contaminant dans les préparations pour nourrissons .Elle mesure d'environ 1 à 3 µm de long pour 0,5 à 1,5 µm de largeur. Les membres de ce genre sont généralement mobiles avec une ciliature pérित्रiche et sont dotés de pilus de classe 1(1, 3,4). La température optimale de croissance est d'environ 39°C mais peuvent se multiplier entre 5,5°C et 47°C. Leur génome possède un ratio de G + C de 57 %. [13], [16], [30] et [31]

Selon l’OMS et la FAO, les temps de génération pour *Cronobacter sakazakii* des souches cliniques et alimentaires, oscillaient à 10°C entre 4,15 et 5,52 heures et à 22°C entre 37 et 44 minutes et pour les souches des préparations reconstituées étaient de 13,7 heures, 1,7 heure et 19-21 minutes à 6°, 21° et 37°C respectivement. [4]

Cronobacter Sakazakii s’est avéré plus résistant au stress osmotique et à la dessiccation que d’autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le pH optimale est compris entre 5-9 selon les souches cependant le pH extrême est d’environ 3,89 – 10. [11] et [13]

3. Les caractères biochimiques de *Cronobacter sakazakii*

Les caractères biochimiques de *Cronobacter sakazakii* sont représentés dans le tableau 9.

Tableau 9: les caractères biochimiques de *Cronobacter sakazakii*. [32]

Caractères biochimiques	Réactions
ONPG	+
ADH	+
LDC	-
ODC	+
CIT	+
H ₂ S	-
Uréase	-
TDA	-
IND	-
VP	+
GEL	+
GLU	+
MAN	+
INO	+
SOR	-
RHA	+
SAC	+
MEL	+
AMY	+
ARA	+
<i>Cyt-ox</i>	-

- réaction positive : +
- réaction négative : -

4. Les caractères culturels

Cronobacter sakazakii peut former deux types de colonies (brillantes et/ou mates) selon le milieu et la souche. Ces deux types de colonies ne sont pas associés à des différences dans la virulence ou des caractéristiques phénotypiques. De même, il n'a pas été caractérisé de facteurs de virulence ou de pathogénicité associés, à l'exception d'une sorte d'entérotoxine. [16]

5. Milieux de culture

5.1. Les milieux solides

Les *Cronobacter* spp se développent sur des milieux utilisés pour les microorganismes entériques, tels la gélose de Mac Conkey, la gélose au désoxycholate DL et la gélose VRBG, et la gélose de TSA, La gélose ESIA, DFI, ChromoCult. [13]

5.1.1. La gélose de Mac Conkey : Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram⁻ parce qu'il contient deux inhibiteurs de la flore Gram⁺ : les sels biliaires, le cristal violet, comme *Salmonella* et *Shigella* ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques. [33] et [34]

5.1.2. La gélose au désoxycholate DL : Milieu sélectif pour le dénombrement des coliformes en microbiologie alimentaire (analyse des eaux et des aliments).contient 2 inhibiteurs des bactéries Gram⁺ à faible concentration : le désoxycholate (sels biliaires), le citrate de sodium. [35]

5.1.3. La gélose VRBG: est recommandée pour la recherche et le dénombrement des coliformes dans les aliments et les produits pharmaceutiques. [36]

Pour l'isolement à partir de produits possiblement contaminés tels que les produits laitiers, les PP ou les selles, des milieux chromogènes sélectifs des *Cronobacter* spp. Sont disponibles sur le marché depuis quelques années. Ils utilisent l'activité de L⁺-D-glucosidase spécifique à ces pathogènes pour métaboliser certains substrats chromogènes, notamment le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-a-D-glucopyranoside qui entre dans la composition des géloses. [13]

5.1.4. La gélose ESIA : Pour la présomption et l'isolement de *Cronobacter sakazakii*. Stocké dans un endroit de 8 - 15 °C, après Incubation à 44 °C pendant 24 h donne des Colonies vertes/bleues cas d' *Enterobacter sakazakii* ou des colonies rouges/incolores dans le cas d' *Escherichia coli*. [37]

5.1.5. La gélose DFI : est décrite pour la détection sélective de ce pathogène émergent. Le milieu est basé sur la réaction d'alpha-glucosidase qui est détectée à l'aide du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-alpha, D-glucopyranoside (XalphaGlc). *Cronobacter sakazakii* hydrolyse ce substrat en un pigment indigo, produisant des colonies bleues-vertes sur ce milieu. [38]

5.1.6. La gélose ChromoCult: Est une gélose chromogène pour le dénombrement d'*Escherichia coli* et de bactéries coliformes dans l'eau de piscine désinfectée, l'eau potable, l'eau provenant des usines de traitement des eaux. Le comptage d'*E. coli* est basé sur le clivage des deux substrats : D -glucuronide par β -D-glucoronidase et D- Galactose par la β -D-galactosidase, une enzyme qui est caractéristique d'*E. coli*. Lorsque les deux substrats sont clivés, ceci permet aux colonies de prendre une couleur bleue foncée à violet comme par opposition au rouge saumon les autres colonies de bactéries coliformes. Les bactéries non coliformes apparaissent incolores ou dans de rares cas sous forme de colonies turquoises. [39]

5.1.7. Milieu TSA : Milieu d'utilisation générale permettant la croissance et l'isolement d'une grande variété de microorganismes. Il peut-être additionné de 5 à 7 % de sang pour déterminer les réactions hémolytiques. Stocké à une température de 2-8 °C et l'incubation est à déterminer en fonction des bactéries recherchées [40]

5.2. Les bouillons

Les bouillons sélectifs pour l'enrichissement des milieux spécifiques aux *Cronobacter spp.* sont ceux habituellement utilisés pour les coliformes, à savoir :

5.2.1. Le bouillon de Mossel : Appelé aussi bouillon EE est utilisé notamment, dans la méthode de la US Food and Drug Administration pour l'isolement et la numération des *Cronobacter spp.* Dans les préparations en poudre.

5.2.2. Le bouillon ESSB : Sélectif des *Cronobacter spp.*, est le bouillon sélectif au lauryl-sulfate et tryptose préconisé par la méthode ISO/TS 22964; il est modifié' par l'ajout d'une plus forte concentration en NaCl et par l'addition de vancomycine.

5.2.3. Le bouillon ESE: récemment proposé par Iversen et Forsythe pour favoriser la récupération maximale des *Cronobacter spp.*, est caractérisé par le remplacement du lactose, source d'hydrate de carbone usuelle dans les bouillons d'enrichissement pour entérobactéries, par du saccharose pouvant être fermenté par les *Cronobacter spp.*, et non par certaines autres entérobactéries également à glucosidase positive. Partant de ce principe, Iversen et al, ont élaboré le bouillon CSB, un bouillon différentiel permettant à une plus grande variété d'espèces de

Cronobacter de se développer, notamment à 42 °C. Le pourpre de bromocrésol entrant dans la composition de ce bouillon facilite, de plus, la vérification de la croissance bactérienne grâce à une coloration jaune qui apparaît avec la baisse de pH due à la fermentation du saccharose. [13]

6. La résistance aux antibiotiques

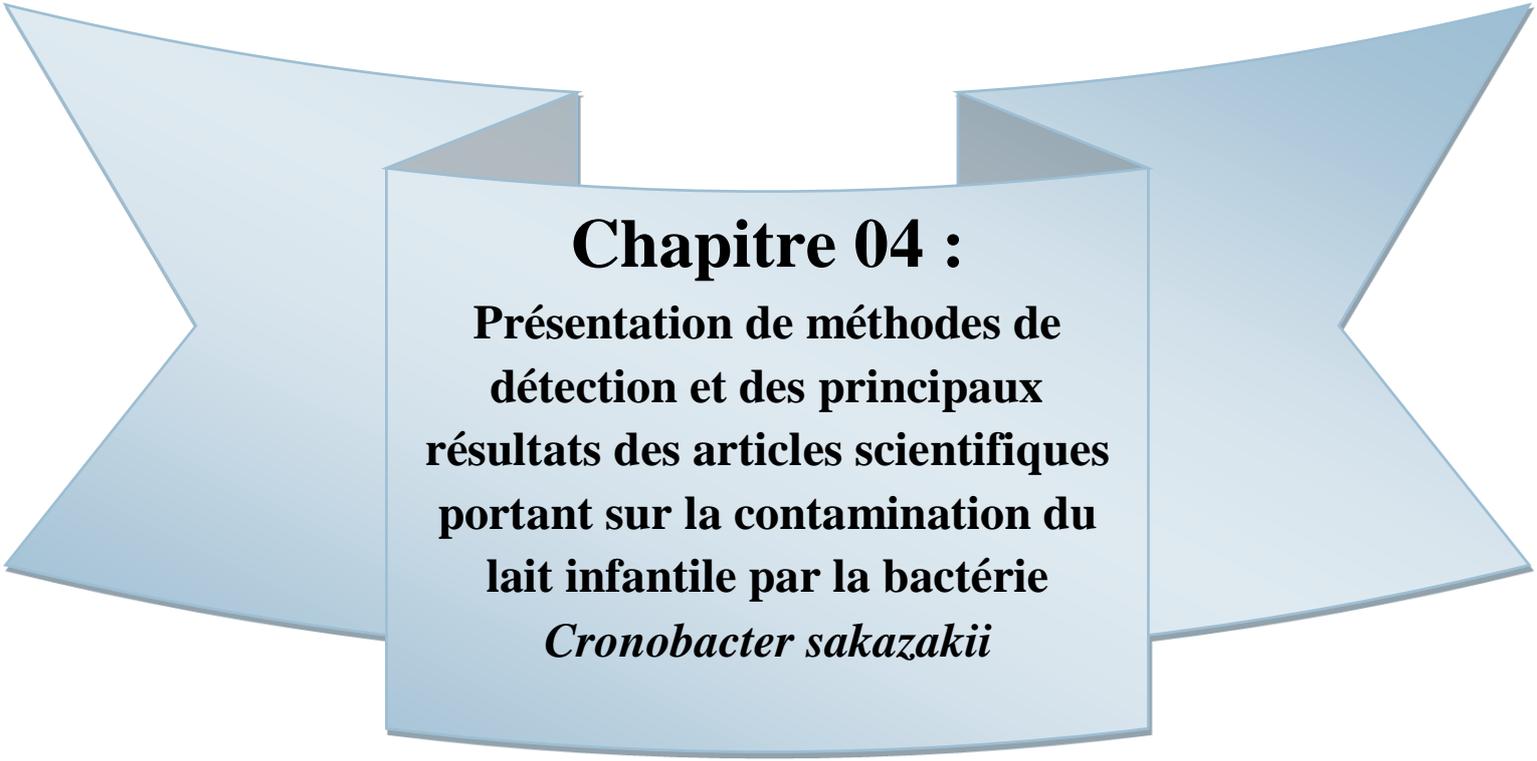
La sensibilité aux antibiotiques d'une bactérie semble importante pour évaluer si les risques associés à la maladie à ce dernier doivent être minimisés et les résultats pourraient fournir des informations utiles dans le traitement des patients.

Un traitement antibiotique est indiqué dans les cas d'infection humains de *Cronobacter* et s'est avérée efficace.

De nombreux chercheurs ont démontré que *Cronobacter spp* peut-être inactivé par les antibiotiques, mais les nouveaux antibiotiques considérés comme adéquats aujourd'hui pour le traitement peuvent être inadéquats à l'avenir et le contraire, parce que les bactéries sont exposées à divers facteurs dans leurs environnements ou pendant la transformation des aliments qui peuvent être causés par des effets physiques (chaleur, pression et rayonnement) ou un stress chimique (acides, alcalins, éthanol, chlore, sels et oxydants) ... etc. [41]

En 2017, en Europe les tests de résistance aux antimicrobiens ont montré une sensibilité à tous les antibiotiques testés.

Pour 20 des 21 isolats humains, les souches de *Cronobacter* semblent être plus sensibles par rapport aux autres membres de la famille des *Enterobacteriaceae* aux «antibiotiques d'accès clé» de la liste modèle des médicaments essentiels de l'Organisation mondiale de la santé, tels que l'ampicilline, les aminosides, le chloramphénicol et les céphalosporines de troisième génération (le dernier est inclus dans la liste médicaments essentiels uniquement pour des indications spécifiques et limitées) après avoir été résistantes aux antibiotiques les plus couramment utilisés pour le traitement initial des infections soupçonnées à *C. sakazakii* en 1997. [42]



Chapitre 04 :
**Présentation de méthodes de
détection et des principaux
résultats des articles scientifiques
portant sur la contamination du
lait infantile par la bactérie**
Cronobacter sakazakii

1. Introduction

Il s'agit d'une étude descriptive et comparative présentant des méthodes de détection et des principaux résultats de quelques articles scientifiques portant sur la contamination du lait infantile par la bactérie *Cronobacter sakazakii*.

Les préparations en poudre pour nourrisson au moyen de procédés semi-industriels ou artisanaux sont constituées de divers produits nutritifs.

Ces derniers peuvent être contaminés lors de la préparation, des procédures de reconstitution ou lors de leur transport et leur stockage.

Les nouveau-nés sont considérés comme faisant une partie du groupe d'individus à haut risque, car leur système immunitaire n'est pas encore complètement développé et peut donc être facilement infecté par des microbes. Par conséquent, il est raisonnable que les produits utilisés soient plus sûrs que les aliments pour adultes ayant développé plusieurs mécanismes de défense contre les infections. La surveillance de la qualité microbiologique des préparations en poudre pour nourrissons est une nécessité afin de garantir leur innocuité et prévenir la survenue de toxi-infection collective.

Ce chapitre a pour but de décrire et présenter les différentes méthodes d'isolement et d'identification et l'étude de la résistance aux antibiotiques ainsi que les résultats tirés de la littérature.

2. Les méthodes d'isolement et d'identification

Les analyses microbiologiques (préparation des solutions mères, réalisation des dilutions, modes d'ensemencement, temps et température d'incubation) ont été effectuées selon le protocole préconisé par les experts de l'Institut Pasteur d'Algérie.

Ainsi que sur les dispositions microbiologiques indiquées dans le Journal Officiel de la République Algérienne (JORA N°38, 2014). Avec, parfois, de légères modifications dans les protocoles en fonction de la disposition de produits ainsi que diverses conditions de travail. [1]

La méthodologie de travail adoptée dans cette étude est récapitulée dans la figure 02.

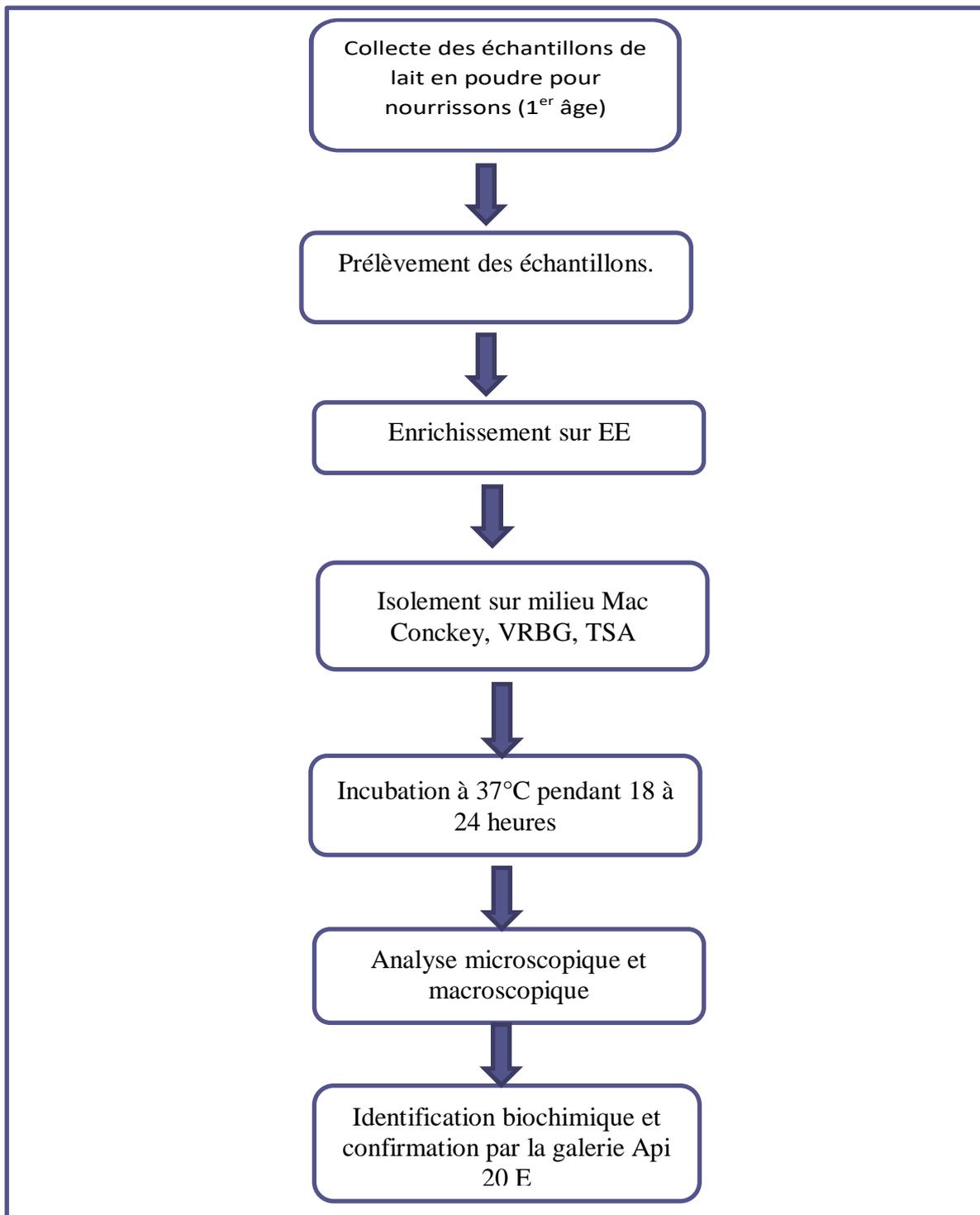


Figure 2 : Diagramme illustrant les différentes étapes expérimentales. [1]

3. La galerie API 20 E

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des entérobactéries comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, elle comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés, les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests, les réactions

produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. (**Annexe 2**)

4. Test de sensibilité aux antibiotiques

Le comportement des souches vis-à-vis des antibiotiques, implique la réalisation de l'antibiogramme sur milieu solide Mueller-Hinton (MH) par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques selon les recommandations du CLSI.

❖ Technique

Préparation de l'inoculum

- Préparer une suspension bactérienne : à partir d'une culture jeune de 18 heures sur gélose Mac Conkey.
- Prélever au moins trois colonies et émulsionner dans 5 ml d'eau physiologique stérile.
- Bien homogénéiser la suspension bactérienne.

Ensemencement

L'ensemencement se fait par la méthode d'écouvillonnage :

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber.
- Le sortir du tube en l'essorant doucement sur la paroi.
- Ensemencer la boîte de Mueller-Hinton dont l'épaisseur de la gélose est de 4 mm, en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.
- Laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 minutes

Application des disques et incubation

Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres. Les disques d'antibiotiques sont répartis sur trois boîtes de Pétri selon la (figure 03). Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.

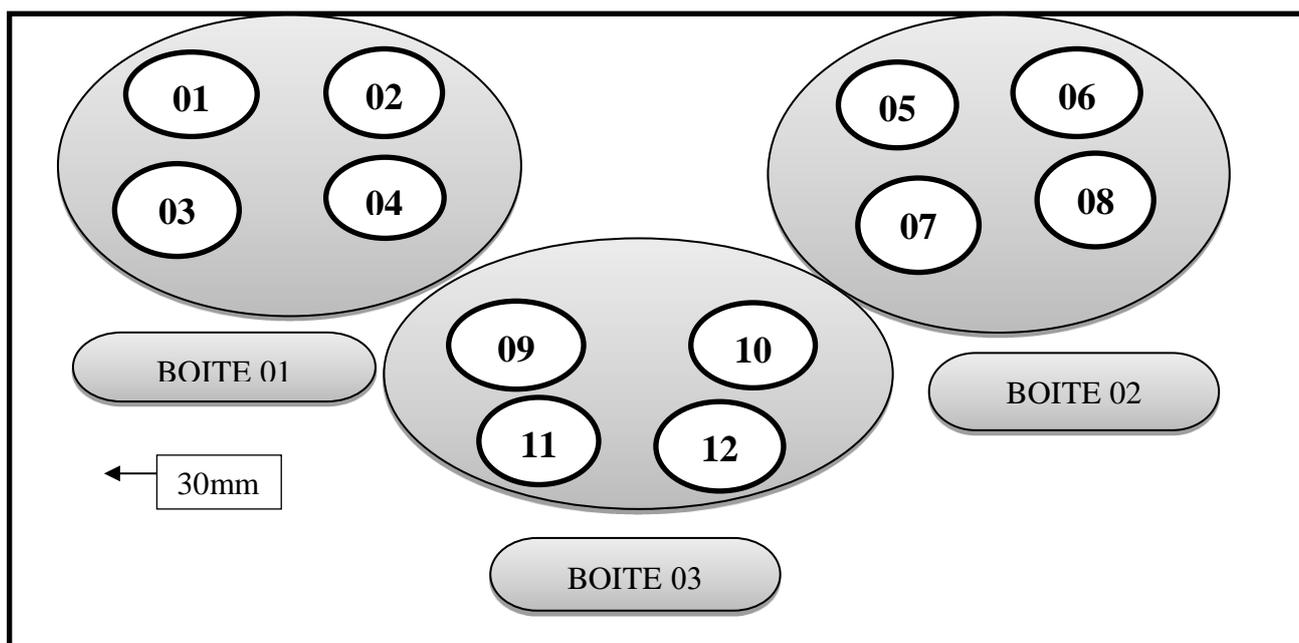


Figure 3 : Schéma explicatif de la disposition des disques d'antibiotiques. [50]

❖ Lecture et interprétation

- Pour chaque antibiotique : mesurer le diamètre de la zone d'inhibition au revers de la gélose, l'interprétation des souches (sensibles, intermédiaires ou résistantes) se fait selon les diamètres critiques recommandés.
- Chaque disque a une concentration minimale inhibitrice, caractérisée par un diamètre d'inhibition, La comparaison des diamètres mesurés autour des disques déposés et ceux recommandés permettra de détecter le phénotype sensible, intermédiaire et résistant.
 - Si le diamètre de la zone d'inhibition est $\geq D$: la souche est dite sensible (S).
 - Si le diamètre de la zone d'inhibition est $< d$: la souche est dite résistante (R).
 - Si $d \leq$ diamètre de la zone d'inhibition $< D$: la souche est dite intermédiaire (I). [47]

5. Résultats

5.1 . Résultats de l'isolement et de l'identification de *Cronobacter sakazakii*

Les résultats de l'isolement et de l'identification macroscopique, microscopiques et biochimiques de *Cronobacter sakazakii* sont représentés dans le tableau 10 ci-dessous :

Tableau 10: Les résultats de l'isolement et de l'identification de *Cronobacter sakazakii* [43], [47], [48], [49] et [50].

Les auteurs	Grahame W, <i>et al</i> 2010.	Fakruddin <i>et al</i> 2014.	Buchera J Albadry <i>et al</i> 2015.	Mohammed M <i>et al</i> 2017	luma A <i>et al</i> 2017.
Les résultats					
Isolement	l'espèce <i>Cronobacter sakazakii</i> se développe bien à 37° C sur des milieux sélectifs, VRBA, Mac Conkey Agar et TSA qui permettent à de nombreuses colonies de <i>C. sakazakii</i> de cultiver.	3 échantillons de lait en poudre sur 15 ont présenté une croissance de <i>Cronobacter sakazakii</i> dans la préparation en poudre pour nourrissons.	seuls 8 sur 12 échantillons (66,7%) ont présenté une croissance de <i>Cronobacter sakazakii</i> dans les préparations pour nourrissons	sur les 125 échantillons étudiés, seulement 9 (7,2%) des échantillons étaient positifs pour <i>Cronobacter sakazakii</i> .	
Aspect macroscopique					
Gélose TSA	indiquent que certaines souches produisent deux types de colonies d'aspect brillant et mat.	les colonies sont pigmentées en jaune	les colonies sont jaunes plates.		les colonies sur le milieu TSA sont jaunes plates.
Gélose VRBG		les isolats de <i>Cronobacter sakazakii</i> apparaissent comme des colonies rouges / roses	les échantillons prélevés de la gélose VRBG apparaissent des colonies mucoïdes de couleur pâle		
Gélose Mac Conkey			Les colonies sont mucoïdes, de couleur rose avec centre foncé		les clones apparaissent roses rouges sur cette gélose.
Aspect microscopique	la coloration de Gram a révélé que l'ensemble des colonies isolées sur Mac Conkey sont des bacilles de petite forme, à Gram négatif dont les cellules étaient de forme simple ou double et pas de formation de spores.				

5.2. Résultats de l'oxydase, la catalase et la nitrate réductase

Les résultats des enzymes respiratoires sont représentés dans le tableau 11.

Tableau 11 : les résultats des enzymes respiratoires. [43], [48] et [51]

Enzymes	Résultats
Test de l'oxydase	La plus part des colonies testées présentent une oxydase négative.
Test de catalase	Toutes les colonies testées sont catalase positive, dont la présence se manifeste par un dégagement de bulles d'air, dès leur contacte avec l'eau oxygénée.
Test du nitrate réductase	Fakruddin <i>et al.</i> 2014 obtiennent une coloration rouge ce qui montre que, les nitrates encore présents, alors cette dernière ne possède pas la nitrate réductase et le test est négatif. par contre Iversen et al. 2006) trouvent les isolats de <i>Cronobacter sakazakii</i> peuvent réduire la nitrate donc le teste est positif et la bactérie possède le nitrate réductase.

5.3. Résultats de la galerie API 20 E

La galerie API 20E a permis d'affirmer les résultats de l'identification de l'espèce.

Les résultats des tests biochimiques selon trois études sont représentés dans le tableau 12 et les figures 4 et 5.

Tableau 12: Résultats récapitulatifs et comparatifs de trois études de la galerie API 20 E. [46], [48] et [52]

Tests biochimiques	(Bushra J Albadry <i>et al</i> ,2015)	(Bouazza S <i>et al</i> 2016)	(Badri N, <i>et al</i> 2016)
ONPG	+	+	+
ADH	+	+	+
ODC	-	-	+
CIT	+	+	+
H ₂ S	-	+	-
Uréase	-	+	-
TDA	-	+	-
IND	-	+	+
VP	-	+	+
GEL	-	+	-
GLU	-	+	+
MAN	+	+	+
INO	+	-	-
SOR	+	+	+
RHA	-	+	+
SAC	+	+	+
MEL	+	+	+
AMY	+	+	+
ARA	+	+	+

Réaction positive : +

Réaction négative : -



Figure 4 : Photographie de l'API 20 E de l'espèce *Cronobacter sakazakii* (Bouazza S *et al* 2016). [46]



Figure 5: Photographie des résultats de l'API 20 E de l'espèce *Cronobacter sakazakii*. (Bushra J Albadry *et al*, 2015). [48]

Bushra J Albadry *et al*, 2015 trouvent un résultat de la galerie API 20 E similaire à celui de Bouazza S *et al*, 2016 à l'exception des tests ODC, H₂S, Uréase, TDA et VP qui présentent un résultat négatif. [46] et [48]

D'après Badri N *et al*, 2016 la galerie API 20 E est analogue à celle de Bouazza S *et al* 2016 à l'exception des tests H₂S, Uréase, TDA et INO qui présentent un résultat négatif.

5.4. Résultats du profil de la sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des germes aux antibiotiques est déterminée à partir du diamètre des zones d'inhibitions qui sont mesurées avec un double décimètre. L'interprétation du test de sensibilité a été faite en fonction des critères de l'antibiogramme selon les recommandations du CLSI.

L'acquisition de la résistance chez les bactéries d'origine alimentaire est un phénomène mondial très largement rapporté avec des taux relativement stables.

D'après Fakruddin *et al* en 2014, la bactérie présente des taux de résistance élevé de 95% vis-à-vis de l'ampicilline, de la pénicilline G, de l'imipénème et de la néomycine et une faible résistance de 60 % est apparue à la vancomycine et à la nitrofurantoïne. Par contre une sensibilité au chloramphénicol et à la gentamycine est remarquée.

En outre, elles présentent un taux de résistance intermédiaire vis-à-vis de la ciprofloxacine (35%) et de l'amikacine, de 18% pour la tétracycline et 15% vis-à-vis de la doxycycline (Figure 6).

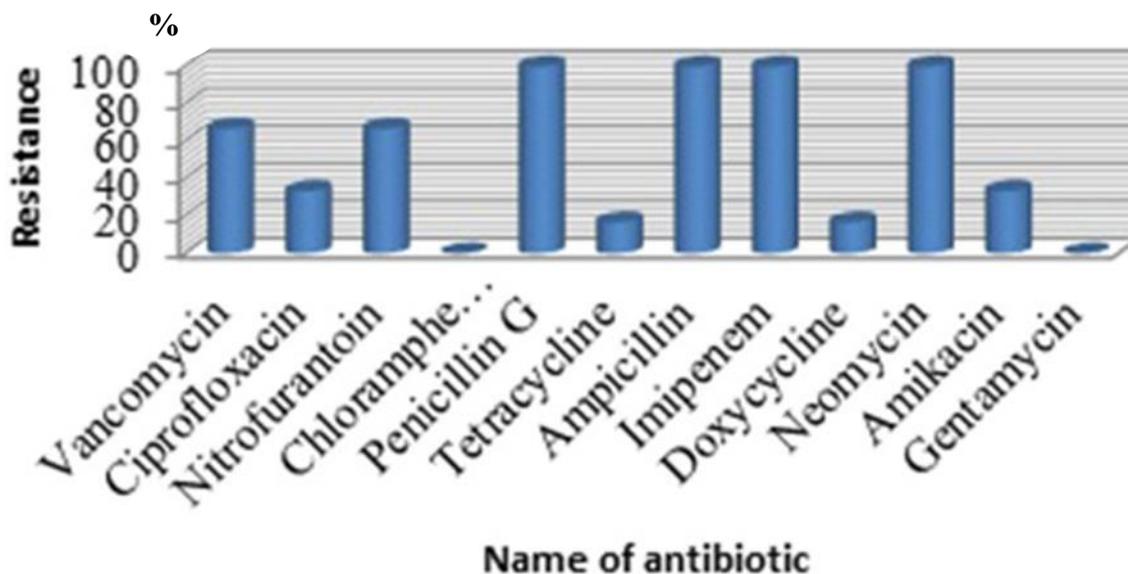


Figure 6 : Résultat de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques traduit en pourcentage. [43]

Selon l'étude rapportée par Mohammed M *et al* 2017, toutes les souches de *C. sakazakii* isolés des échantillons PIF étaient uniformément sensibles à ticarcilline, chloramphénicol, lévofloxacine, ciprofloxacine, moxifloxacine, céfépime, pipéracilline-tazobactam et colistine. Ainsi qu'un isolat était résistant au méropénem et imipénem. Le céfotaxime et la ceftazidime étaient moins efficaces contre ces isolats.

Une autre étude trouve que le profil de sensibilité aux antibiotiques est comme suit : 88,8% des isolats étaient sensibles à l'amoxicilline, à l'ampicilline, à l'aztréonam, acide nalidixique et à la tétracycline, tandis que 33,3% étaient sensibles à la mezlocilline, à la streptomycine et au cotrimoxazole. La résistance à l'amikacine et à la carbénicilline était de 66,6% et pour la tobramycine et la tétracycline elle est de 44,4%. [49]

Une autre étude faite par Buschera J *et al*, 2015 montrent que 100% des isolats étaient résistants à l'ampicilline, à la ceftazidime, à la ticarcilline, / acide clavulanique, à la céphalotine et au céfotaxime, 75% étaient résistants à l'amoxicilline / acide clavulanique. Une faible résistance est apparue à la nitrofurantoïne, à l'acide nalidixique, au céfépime et à la gentamicine à 25% tandis qu'aucune résistance n'est apparue à la pipéracilline, à l'aztréonam, à la ceftriaxone, au chloramphénicol, à la ciprofloxacine, à l'imipénème, à la norfloxacine, à la lévofloxacine et à l'amikacine. [48]

Tableau 13: Pourcentage de résistance aux antibiotiques de *C. Sakazakii* contre 20 types d'antibiotiques selon le CLSI 2007. (n = 4) [48] .

Antibiotiques	Souches résistants No. %	Souche intermédiaires No. %	Souches sensibles No. %
Ampicilline	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Piperacilline	0 (0)	2 (50)	2 (50)
Ticarcilline	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Ticarcilline/A.Clavulanique	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Amoxicilline/ A.Clavulanic	3 (75)	1 (25)	0 (0)
Cephalothine	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Cefotaxime	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Ceftazidime	4 (100)	0 (0)	0 (0)
Ceftriaxone	0 (0)	2 (50)	2 (50)
Cefepime	1 (25)	0 (0)	3 (75)
Imipeneme	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Aztreoname	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Gentamicine	1 (25)	0 (0)	3 (75)
Amikacine	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Acide Nalidixique	1 (25)	2 (50)	1 (25)
Ciprofloxacine	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Levofloxacine	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Norfloxacine	0 (0)	0 (0)	4 (100)
Nitrofurantoin	1 (25)	2 (50)	1 (25)
Chloramphenicol	0 (0)	0 (0)	4 (100)

6. Discussion

6.1. Enrichissement de *Cronobacter sakazakii*

L'eau peptonée permet l'enrichissement à froid des souches de *C.sakazakii*, selon plusieurs auteurs l'enrichissement sur milieu liquide avant l'isolement sur milieu solide a comme but d'augmenter le nombre de *Cronobacter sakazakii* dans les échantillons de préparations de la poudre de lait pour nourrissons (PPPN) analysés. [44]

6.2. Isolement

L'espèce *Cronobacter sakazakii* se développe bien à 37° C sur des milieux sélectifs VRBG, Mac Conkey et TSA qui permettent à de nombreuses colonies de cultiver. [47]

- L'isolement sur Tryptone Soya Agar à 25°C a montré que les souches produisent un pigment jaune non diffusible, ce qui a conduit à la description de « *Enterobacter cloacae* à pigment jaune » ainsi que, la production dépend de la température et encore moins de contraintes produire à 37° C.

L'organisme colonise probablement le matériel végétal, et la pigmentation à base de caroténoïde jaune peut le protéger de radicaux d'oxygène générés par la lumière du soleil.

-L'isolement sur Gélose Mac Conkey a montré des colonies roses rouges, cela indique qu'il s'agit d'une fermentation du lactose car le milieu contient des sels biliaires pour inhiber les bactéries non intestinales et du lactose avec un indicateur rouge neutre pour distinguer *Cronobacter sakazakii* fermentant le lactose. [48] et [50]

6.3. Identification biochimique

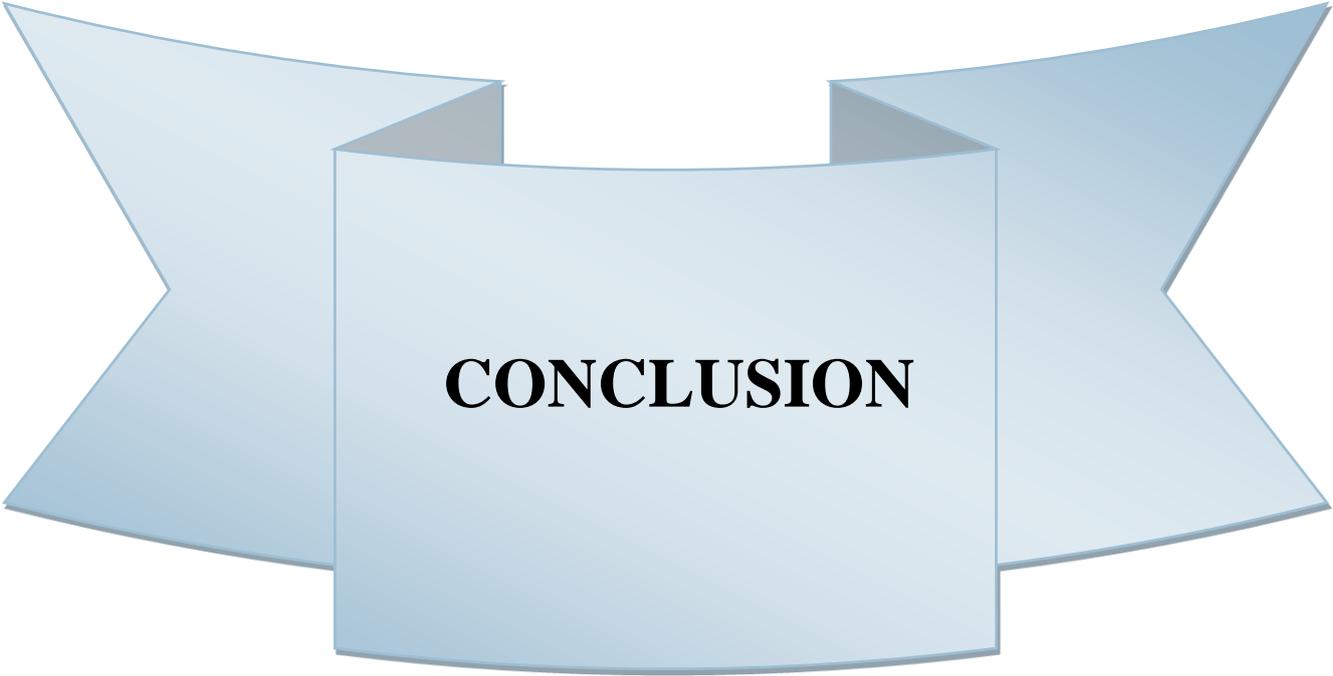
L'identification biochimique révèle une oxydase négative, une catalase positive c'est à dire la capacité de décomposer le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. [43], [48] et [51]

- Après l'ajout des réactifs Nit I et Nit II, Fakruddin et al. 2014 obtiennent une coloration rouge ce qui montre que, les nitrates encore présents dans le milieu ont été réduits en nitrite par le zinc non plus par la bactérie, alors cette dernière ne possède pas la nitrate réductase et le test est négatif, donc absence de la réduction de nitrate en nitrite, par contre Iversen et al. 2006) trouvent que les isolats de *Cronobacter sakazakii* peuvent réduire la nitrate, donc le test est positif et la bactérie possède la nitrate réductase [51].

- Fakruddin *et al* 2014 et bouazza N, 2016 rapportent que l'uréase et de la TDA sont positifs contrairement à Bushra J Albadry, 2015 et Badri N *et al*, 2016 indiquent l'absence de l'activité uréase et TDA, ces tests sont fondamentaux pour identifier *Cronobacter sakazakii* ainsi que la fermentation du glucose à 37°C. [43], [46], [48] et [52].

6.4 .La sensibilité aux antibiotiques des isolats

On remarque que les auteurs rapportent des résultats similaires vis-à-vis des antibiotiques : chloramphénicol, l'ampicilline et acide nalidixique d'une part et d'autre part ils ont indiqué des résultats opposés vis-à-vis des antibiotiques : ciprofloxacine, gentamicine et imipénème ce qui peut résulter soit d'une mutation soit de l'acquisition d'un gène de résistance conférant la résistance à un ou plusieurs antibiotiques.



CONCLUSION

Conclusion

Les préparations pour nourrissons qui sont devenues la principale et importante source d'alimentation des nourrissons, ont été trouvées contaminées par des bactéries. L'existence de ces microorganismes d'altération ou pathogènes ne peut pas être tolérée car ils présentent un risque majeur pour la santé du consommateur (les nourrissons et les jeunes enfants). Ainsi, les principales bactéries isolées de ces échantillons sont : *Cronobacter sakazakii*.

Cette dernière est responsable des infections chez les nouveau-nés et les nourrissons ; en particulier ceux qui sont prématurés ou immunodéprimés.

L'espèce *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii* de pigment jaune) appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*, ce sont des bacilles, à Gram négatif, anaérobie facultatif, asporulés, encapsulés, mobiles avec une ciliature péritriche et sont dotés de pilus de classe 1.

La température optimale de croissance est d'environ 39°C mais peuvent se multiplier entre 5,5°C et 47°C), leur pH optimale compris entre 5-9 selon les souches cependant le pH extrême environ 3,89 – 10.

Pour ces raisons, on a étudié les analyses microbiologiques de routine de détection des Entérobactéries, qui permettent de vérifier que le produit ne présente pas de risque pour la santé du consommateur, en tenant compte des conditions de conservation, des habitudes de consommation et des caractéristiques du produit. Il convient donc de s'assurer, par des tests microbiologiques, que le produit est sain et de bonne qualité hygiénique tout au long de sa durée de vie.

Devant la crise sanitaire du COVID19, notre étude s'est inspirée des résultats obtenus dans la littérature, présentant les méthodes de détections et les principaux résultats des articles scientifiques portant sur la contamination de la poudre du lait infantile par la bactérie *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii* de pigment jaune) appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*

L'étude de l'aspect morphologique des colonies est la première étape pour l'identification d'une bactérie, suivit de l'identification biochimique, montre que l'enrichissement dans de l'eau péptonée et l'isolement sur milieux Mac Conkey, VRBG et TSA à 37°C pendant 18 à 24 heures,

CONCLUSION

s'est révélé être une méthode efficace pour l'isolement de l'espèce de *Cronobacter sakazakii* à partir des échantillons de préparation en poudre de lait infantile et les préparations pour nourrissons.

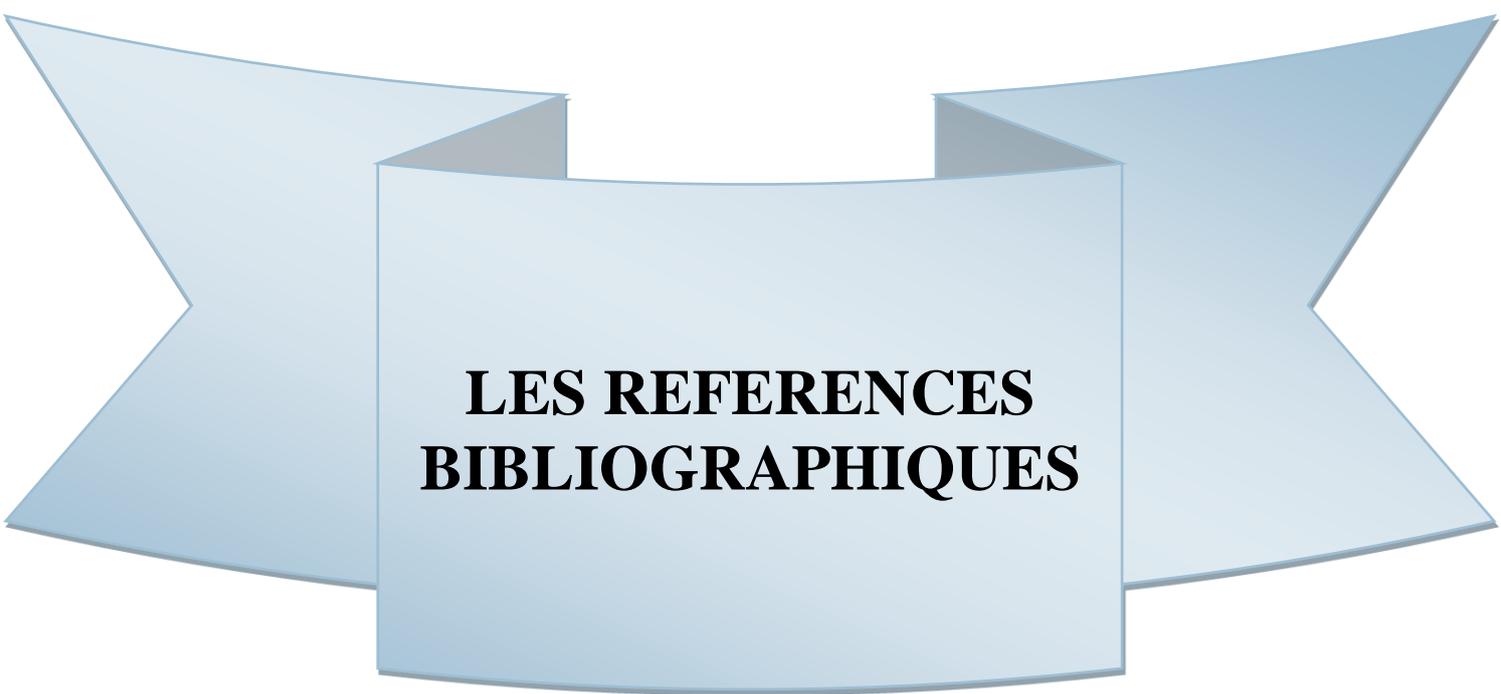
Cette espèce présente les caractéristiques suivantes : bacilles à Gram négatif, oxydase -, catalase +, glucose +, mannose +, H₂S -, uréase -, indole-, TDA -, incapable de réduire les nitrates en nitrites, VP -, mannitol +, elle est mobile à 39°C, ONPG +, ADH +, ODC -, LDC- et utilise le citrate comme seule source de carbone.

Les résultats de la sensibilité aux antibiotiques nous ont permis de constater que l'espèce *C. sakazakii* est marquée par une sensibilité vis-à-vis la gentamycine, l'amikacine, chloramphénicol, tétracycline et ciprofloxacine par contre, elle présente une résistance pour l'ampicilline ainsi que l'imipénème.

Perspectives

Il est souhaitable, en perspectives, de réaliser :

- Une étude prospective.
- Une étude phénotypique et génétique en utilisant les techniques de base de haute performance comme : l'extraction de l'ADN, la PCR, le séquençage.
- Caractérisation moléculaire de la résistance aux antibiotiques.
- Etude de facteurs de virulence.



**LES REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références bibliographiques

[1]-**Benchikh, H. (2019)**.Contribution à l'évaluation des risques microbiologiques et de la stabilité physicochimique pour quelques marques du lait infantile en poudre (premier âge), commercialisées en Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master : Microbiologie Appliquée. Bordj Bou Arreridj : Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi B.B.A, 94P. [en ligne] disponible sur: <http://dspace.univ-bba.dz/browse?type=author&value=Benchikh+Hadjer.%2C+Fandi+Soumia> (page consulté le 20/09/2020)

[2]-**Hadj A.I. (2018)**. Les risques de contamination du lait infantile Dus à des défauts de conditionnement et à son inadéquate conservation. Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme master: Technologie agroalimentaire et contrôle de la qualité. Université : Bouira akli mohand oulhadj, 88P. [en ligne] .disponible sur : <http://dspace.univ-bouira.dz:8080/jspui/bitstream/123456789/2029/1/> (page consulté le 21/09/2020)

[3]- **Abdesselam, K., Pagotto, F. (2014)**. Bacteria: Cronobacter (Enterobacter) Sakazakii and Other Cronobacter Spp. In Encyclopedia of Food Safety. [en ligne] (page consulté le 19/09/2020) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00097-4>.

[4]- **Cronobacter Sakazakii - an Overview. ScienceDirect Topics** . [en ligne] (page consulté le 19/09/2020) <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/cronobacter-sakazakii>.

[5]- **follain,C.(2015)**. les lait infantile : analyse comparative et rôle du pharmacien. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie : science pharmaceutique : université de Rouen : UFR de médecine et de pharmacie, 127P [en ligne] disponible sur : <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01264820/document> (page consulté le 02/03/2020)

[6]- **Familiprix**. Vitamines et produits naturels- Vitamine B3 (niacine). [en Ligne] (page Consulté le 18 mars 2020). Disponible sur : <https://www.familiprix.com/fr/produits-naturels/vitamine-b3-niacine>.

[7]-**Frayssinhes, L. (2017)** .Implication du microbiote intestinal dans la santé et enjeux thérapeutiques. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie: science pharmaceutique: université Toulouse III Paul Sabatier faculté des sciences pharmaceutique 92 [en ligne] disponible sur : <http://thesesante.upstlse.fr/1649/#:~:text=On%20sait%20d> (page consultée le 16/03/2020).

LES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [8]-**OMS et FAO.** *Enterobacter sakazakii* et autres micro-organismes présents dans les préparations en poudre pour nourrissons [en ligne]. (la page Consulté le 15 mars 2020). <http://www.fao.org/3/y5502f/y5502f0a.htm>.
- [9]-**Grosdemange, A. (2014),** Impact du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'enfant [en ligne]. Thèse pour obtenir le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie : Sciences pharmaceutiques : université de lorraine 118P disponible sur : <https://www.familiprix.com/fr/produits-naturels/vitamine-b3-niacine>.<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731902> (page consultée le 16/03/2016)
- [10]- **Le ministre du commerce Bekhti, B. et Le ministre de la santé, de la population et de la réforme hospitalière Abdelmalek, B. et al. (2016).** *Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire.* N° 39 [en ligne] (page consultée le 16/03/2020)
- [11]- **Farmer, John J (2015).** My 40-Year History with *Cronobacter /Enterobacter sakazakii* – Lessons Learned , Myths Debunked, and Recommendations. *Frontiers in Pediatrics* [en ligne], 3 (84) (date de consultation 04/03/2020) <https://doi.org/10.3389/fped.2015.00084>.
- [12]- **Anses** (agence nationale de sécurité sanitaire alimentaire, environnement, travail. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments Avril 2011 [en ligne]. (page consultée le 18/02/2020) <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2000sa0003Fi.pdf>
- [13]- **Proudy, I. (2009).** *Cronobacter spp.* (“*Enterobacter sakazakii*” sensu lato) : implication dans la contamination des préparations en poudre pour nourrissons et enfants en bas âge. *Canadian Journal of Microbiology* [en ligne], 55 (5) (date de consultation 07/03/2020) <https://doi.org/10.1139/W08-131>
- [14]-<https://www.sciencephoto.com/media/874033/view/cronobacter-sakazakii-gram-negative-sem> (consulté le 06/09/2020)
- [15]- **LPSN** (Liste des noms procaryotes avec position dans la nomenclature). [en ligne] (Page consulté 10/03/2020). <https://lpsn.dsmz.de/family>
- [16]- **Affssa** (agence française de sécurité sanitaire des aliments). [en ligne] (Page consultée le 18/02/2020) <http://umvf.omskosma.ru/infectiologie/www.infectiologie.com/site/medias/>

[17]-**Dromigney,E (2012)** . Les critères microbiologiques des denrées alimentaires : réglementation, agents microbiens, autocontrôle. Paris : TEC & DOC-Lavoisier. 357 P

[18] - **Dodd, C. E. R. (2017)**. Infrequent Microbial Infections. Foodborne Diseases, [en ligne] (date de consultation 15/03/2020) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.000139>.

[19]- **Rappel d'une Poudre Pour Nourrissons**. [En ligne] (Page consulté le 03/09/2020). <https://www.lapresse.ca/societe/sante/2019-10-07/> .

[20] - **Iversen, Carol, Niall, M., Barbara Mc. et al (2008)**. *Cronobacter* Gen. Nov., a New Genus to Accommodate the Biogroups of *Enterobacter Sakazakii*, and Proposal of *Cronobacter Sakazakii* Gen. Nov., Comb. Nov., *Cronobacter Malonaticus* Sp. Nov., *Cronobacter Turicensis* Sp. Nov., *Cronobacter Muytjensii* Sp. Nov., *Cronobacter Dublinensis* Sp. Nov., *Cronobacter* Genomospecies 1, and of Three Subspecies, *Cronobacter Dublinensis* Subsp. *Dublinensis* Subsp. Nov., *Cronobacter Dublinensis* Subsp. *Lausannensis* Subsp. Nov. and *Cronobacter Dublinensis* Subsp. *Lactaridi* Subsp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en ligne], 58 (6) (date de consultation 15/03/2020) <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65577-0> .

[21]-**Alsonosi, A.M., Holy, O. et Forsythe, S.J. (2018)**. Characterization of the pathogenicity of clinical *Cronobacter malonaticus* strains based on the tissue culture investigations. *Antonie van Leeuwenhoek* [en ligne], 112 (page consulté le 19/03/2020) <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1178-6>

[22]-**Fehr, A ., Athmanya K . E ., Stephan CF. N .et al. (2015)**. Evaluation of Zebrafish as a Model to Study the Pathogenesis of the Opportunistic Pathogen *Cronobacter Turicensis* . *Emerging Microbes & Infections* [en ligne] 4 (5) (page consulté le 28/03/2020). <https://doi.org/10.1038/emi.2015.29>.

[23]-**Stephan, R., Angelika ,L., Patrick ,T. et al. (2011)**. Complete Genome Sequence of *Cronobacter Turicensis* LMG 23827, a Food-Borne Pathogen Causing Deaths in Neonates. *Journal of Bacteriology* [en ligne], 193 (1) (page consulté le 30/03/2020). <https://doi.org/10.1128/JB.01162-10>.

[24]- **Jaradat, Ziad W., Al Mousa,W., Elbetieha,A. et al . (2014)**. *Cronobacter Spp.--* Opportunistic Food-Borne Pathogens. A Review of Their Virulence and Environmental-Adaptive Traits . *Journal of Medical Microbiology* [en ligne], 63 (8) (page consulté le 24/03/2020) <https://doi.org/10.1099/jmm.0.073742-0>

- [25]-**Joseph, S., Esin ,C., Hana ,D., et al. (2012).** *Cronobacter Condimenti* Sp. Nov., Isolated from Spiced Meat, and *Cronobacter Universalis* Sp. Nov., a Species Designation for *Cronobacter* Sp. Genomospecies 1, Recovered from a Leg Infection, Water and Food Ingredients . *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [en ligne], 62 (6) (page consulté le 25/03/2020) <https://doi.org/10.1099/ijs.0.032292-0>.
- [26]-**Sullivan, D. J., Gary, P. Moran., Emmanuelle P. et al .(2004).** Comparison of the Epidemiology, Drug Resistance Mechanisms, and Virulence of *Candida Dublinensis* and *Candida Albicans* . *Fems Yeast Research* [en ligne], 4 (4-5) (date de consultation 01/04/2020) [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00240-X](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00240-X).
- [27]-**Thpanorama** .Caractéristique de *Cronobacter Sakazakii*. Maladie et symptômes [en ligne] (page consulté le16/06/2020) <https://www.thpanorama.com/blog/ciencia/cronobacter-sakazakii-caractersticas-enfermedades-sntomas.html>
- [28]**The Naming Of *Cronobacter sakazakii*** | Food Safety News. [en ligne] (page consulté le 19/09/2020). <https://www.foodsafetynews.com/2009/09/the-naming-of-cronobacter-sakazakii/>.
- [29]-**I'Académie nationale de Pharmacie**. [en ligne] (page consulté le 04/07/2020) https://dictionnaire.acadpharm.org/w/Cronobacter_sakazakii
- [30]-**Emilie,L.(2016)**. Compréhension de l'inactivation des bactéries pathogènes présentes dans des produits alimentaires déshydratés, thèse Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comte. Discipline : Science de l'alimentation.Université de bourgogne franche-comte. Ecole doctorale Environnement Sante,250P. [en ligne]. disponible sur :<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01499649> (page consulté le 05/07/2020)
- [31]-**Agence de la santé publique du Canada.(2011).**Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes 2010 [en ligne] .(page consultée le 30/04/2020) <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire>
- [32]- **BacDive**.[en ligne] .(date de consultation du sit 12/06/2020) <https://bacdive.dsmz.de/dlselect>.
- [33]-**Bio-Rad** .milieux d'isolement sélectif des entérobactéries [en ligne] (page consulté le13/06/2020) http://www.biorad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/Fiches_Techniques

[34]-**Grosseron**. Mac Conkey - Gélose de [Par Milieux] [en ligne] (la page Consulté le 13/06/2020). https://www.grosseron.com/mac-conkey-gelose-de_51-385-1-851-1-2374.html.

[35]-**Bensalah, A. (2010)**. Contribution à l'évaluation de la qualité physico-chimique et bactériologique de lait cru et diagnostique de brucellose et mammites dans la région de Tlemcen en Algérie . Diplôme d'ingénieur d'état: Technologie des industries agroalimentaires, Tlemcen: université Abou Beker Belkaid, 70p (consulté le 03/07/2020). https://www.memoireonline.com/10/12/6336/m_Contribution--l-evaluation-de-la-qualite-physico-chimique-et-bacteriologique-de-lait-cru-et-dia40.html.

[36]-**Indicia** .Gélose VRBG (Violet Red Bill Glucose Agar) [en ligne] (page consulté le 01/07/2020). https://www.humeau.com/media/blfa_files/TC_490-VRBG_FR_030315.pdf

[37]-**Dominique DUTSCHER**. Matériel de laboratoire Gélose chromogénique Enterobacter sakazakii [en ligne] (page consulté le 15/06/2020) <https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0ZAGA-01-24>

[38]-**Iversen, C., Druggan, P., et Forsythe, S. (2004)**. A Selective Differential Medium for *EnterobacterSakazakii*, a Preliminary Study . *International Journal of Food Microbiology* [en ligne] 96 (2) (page consulté le 02/07/2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.024>.

[39]-**Gélose Coliformes Chromocult** . Détection simultanée des bactéries coliformes et de E. coli dans l'eau [en ligne] (page consulté le 13/06/2020) [file:///C:/Users/infodz/Downloads/DS4485FR00_Chromocult%20Coliform%20\(6-25\)%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/infodz/Downloads/DS4485FR00_Chromocult%20Coliform%20(6-25)%20(1).pdf)

[40]-**Dominique DUTSCHER**. Matériel de laboratoire T.S.A. - Gélose tryptone caséine soja - Milieux de culture - Milieux de culture bactériolo. [en ligne] (page consulté le 16/06/2020) <https://www.dutscher.com/frontoffice/product?produitId=0ZAGA-01-67>.

[41]-**Al-Nabulsi, A., Tareq ,M., Osaili, N. et al. (2011)**. Impact of Environmental Stress Desiccation, Acidity, Alkalinity, Heat or Cold on Antibiotic Susceptibility of *Cronobacter Sakazakii* . *International Journal of Food Microbiology* [en ligne] 146 (2) (date de consultation le 19/09/2020) <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.013>.

[42]- **Lepuschitz, S., Werner ,R., Shiva, P. et al. (2017)**. Multicenter Study of *Cronobacter Sakazakii* Infections in Humans, *Emerging Infectious Diseases Journal - CDC* . [en ligne] 25 (3) ,(consulté le 20/09/2020). <https://doi.org/10.3201/eid2503.181652>.

[43]-**Fakruddin, M.d., Mizanur, R., Monzur M.A. et al. (2014)**. Stress tolerant virulent strains of *Cronobacter sakazakii* from food. *Biological Research* [en ligne] 47 (1).(la date de consultation 18/09/2020) <https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-63>.

[44]- **Mennour, M., Djemal,M. (2019)**.Recherche et identification de *Yersinia spp* au niveau des sols et des eaux des lacs des régions de Djebel El Ouahch et de El Meridje: mémoire de master:Sciences Biologiques:Biologie Moléculaire des Microorganismes: Université des Frères Mentouri Constantine,83P.

[45]-**Oudina, R., Saioudi, S. (2013)**. étude de la qualité microbiologique des surfaces et des ustensiles dans les restaurants collectifs. mémoire de master :santé eau et environnement: Microbiologie de l'environnement: université de 8 mai 1945 Guelma,101P.disponible sur <http://dspace.univguelma.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1877/M570.340%20ECOLOGIE.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (page consulté le 20/09/2020)

[46]-**Bouazza, S., Bouakka, N. (2016)** ,Recherche des entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre élargi dans la viande rouge.Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de master : Microbiologie appliquée à la sante et à l'environnement : Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie: université de Tbessa,92P.disponible sur <http://www.univ-tbessa.dz/fichiers/masters/sesnv160058.pdf> (page consulté le 20/09/2020)

[47]-**Oxoid as a service to Microbiology**, Culture2010 [en ligne] (page consultée le 23/9/2020) disponible sur <http://www.oxoid.com/culture/Culture-31-1.pdf>

[48]- **Buchera J Albadry., Amany,S., Murtada, H.H. et al. (2015)**. diagnostic of *Enterobacter sakazakii* from samples of infant milk,stool and haboubi hospital environment in dhi qar province and study the sensitivity for somz antibiotics.*World Journal of Pharmaceutical Research*. 4 (10) (page consultée le 18/09/2020) <https://www.researchgate.net/publication/319108848>

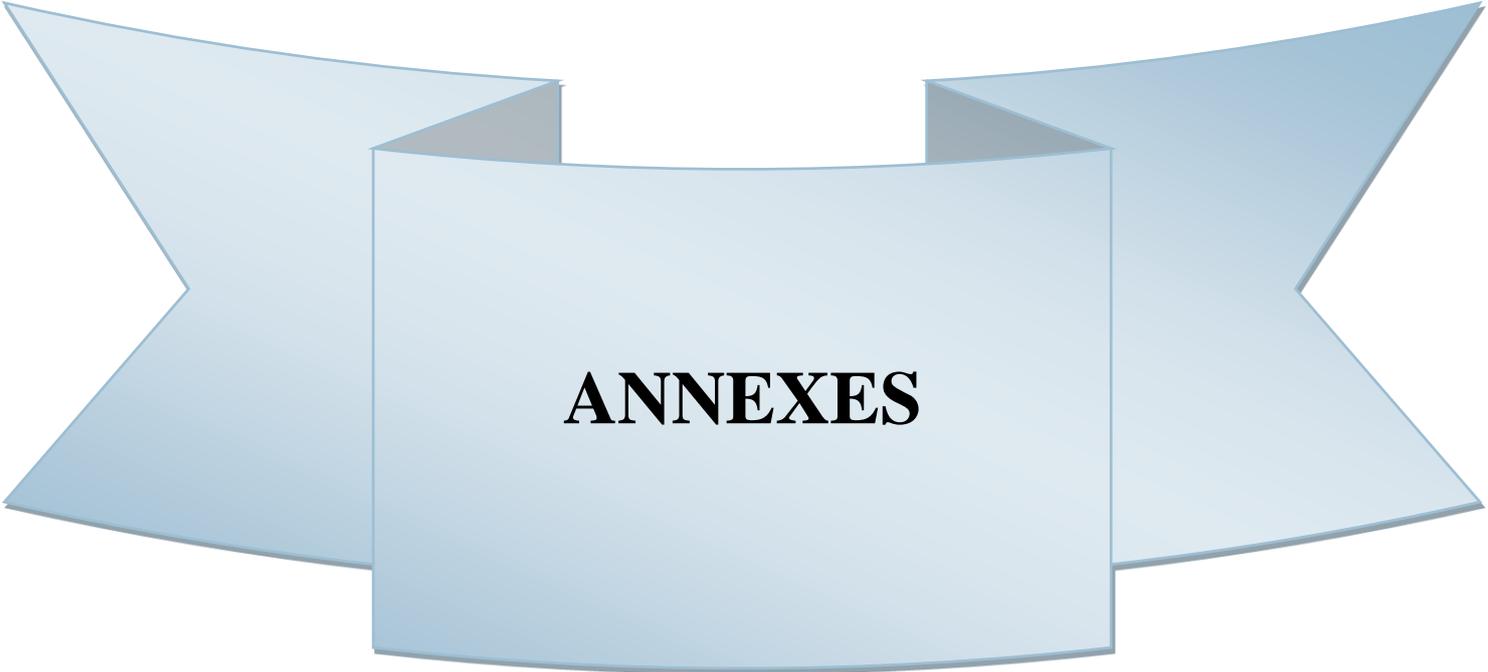
[49]-**Mohammad ,M., Jalal M. (2016)**. Study of *Cronobacter Sakazakii* Strains Isolated from Powdered Milk Infant Formula by Phenotypic and Molecular Methods in Iran.*Archives of Pediatric Infectious Diseases*.5(1)(page consultée le18/09/2020) <https://www.researchgate.net/publication/307902551>

[50]-**Luma,A. (2017)**. Investigate of the Ability of *Cronobacter sakazakii* isolated from Clinical Samples of Children Under Two Year to Induce Swarming and Biofilm.*ibn al-Haitham le journal*

for ure and applied scienc [en ligne],10(30526) (page consultée le 23/11/2020)
<https://www.semanticscholar.org/paper/Investigate-of-the-Ability-of-Cronobacter-sakazakii>

[51]-**Iversen, C., Waddington M., Farmer J. J. et al. (2006)**. The Biochemical Differentiation of *Enterobacter Sakazakii* Genotypes . *BMC Microbiology* 6 (94) (la date de consultation 14/09/2020)
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-94>.

[52]-**Badri, N. (2016)**. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches des *entérobactéries* isolée de fromage frais artisanale "Jben".Mémoire de master. Microbiologie Appliquée à la Sante et l'Environnement. Université de Larbi Tébessi –Tébessa- 126P,disponible sur: <http://www.univ-tebessa.dz/fichiers/masters/sesnv160060.pdf> (la date de consultation 22/09/2020)



ANNEXES

Annexe 01**Eau peptonée (g/l) : pH = 7.2**

Peptone de viande	10
Chlorure de sodium	05
Phosphate di sodique anhydre	3,5
Di hydregéno phosphate de potassium	1,5

Eau physiologique (g/l) : pH= 7

Chlorure	09g
Eau distillée.....	1000 ml

Milieu Mac Conkey (g/l): pH = 7.1

Peptone	20
Lactose	10
Sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,001
Rouge neutre	0,05
Na Cl	05
Agar	15

Milieu VRBG (g/l) : pH 7,4 ± 0,2

Extrait de levure	3,0
Peptone	7,0
Chlorure de sodium	5,0
Sels biliaires n°3.....	1,5
Glucose	10
Rouge neutre	0,03
Cristal violet	0,002
Agar	12,0

ANNEXES

Gélose Caséine Soja (TSA) (g/l) : pH 7.3± 0.2

Hydrolysats pancréatique de caséine	15,0
Hydrolysats enzymatique de soja.....	5,0.
Chlorure de sodium.....	5, 0
Agar.....	15,0
Chromogène.....	0,1

Mueller-Hinton (MH) (g/l): pH 7

Viande de bœuf	30
Hydrolysats de caséine.....	17.5
Amidon.....	1.5
Agar.....	17.0

Annexe 02

La galerie API 20 E

- L'identification biochimique est réalisée par la galerie API 20 E.

a) Principe et description de la galerie API 20E

L'API 20 E est un système standardisé pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

La galerie API 20 E comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (**figure 7**). Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.



Figure 7 : Galerie API 20 E

b) Mode opératoire

Préparation de la galerie

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Incrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte.
- Sortir la galerie de son emballage.
- Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

➤ Préparation de l'inoculum

Préparer une suspension bactérienne dense dans 10 ml d'eau physiologique stérile à partir d'une culture pure et jeune de 18 à 24 h, faite sur GN.

➤ Ensemencement de la galerie

- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le côté pour éviter la formation de bulles d'air

- Pour les caractères soulignés : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, ensemercer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemercer le tubule et la cupule par la suspension.
- Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemercer uniquement le tubule par la suspension.
- Refermer la boîte d'incubation et la placer à 37°C pendant 18 à 24 heures.

c) Lecture de la galerie

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture **(Tableau 14)**.

- Si 3 tests ou plus (test GLU + ou -) sont positifs, noter sur la fiche de résultats toutes les réactions spontanées puis révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs :

-Test TDA : ajouter 1 goutte de réactif TDA. Une couleur marron-rougeâtre indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-Test IND : ajouter 1 goutte de réactif JAMES. Une couleur rose diffusant dans toute la cupule indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

-Test VP : ajouter 1 goutte des réactifs VP 1 et VP 2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose ou rouge indique une réaction positive à noter sur la fiche de résultats.

Une faible coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être considérée négative.

-Test Glu : Ajouter une goutte des réactifs NIT 1 et NIT 2 dans le tube GLU. Attendre 2-5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive (NO₂).

Une réaction négative (coloration jaune) peut être due à la production d'azote :

Ajouter 2-3 mg de poudre de zinc dans la cupule GLU. Après 5 minutes, un tube resté jaune indique une réaction positive à noter sur la fiche des résultats. Si la cupule devient orange-rouge, la réaction est négative, les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zn.

Remarque : le test de la recherche de production d'indole doit être réalisé en dernier, car cette réaction libère des gaz qui risquent d'altérer l'interprétation d'autres tests de la galerie. Ne pas remettre le couvercle d'incubation après l'ajout du réactif.

Si le nombre de tests positifs avant ajout des réactifs (y compris le test GLU) est inférieur à trois :

- Ré-incuber la galerie 24 heures (plus ou moins 2 heures) de plus sans rajouter les réactifs.
- Révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

Tableau 14: Tableau de la lecture de la galerie miniaturisée.

Microtube	Substrat	Caractère recherche	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β-galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H ₂ S	Thiosulfate de sodium	Production d'H ₂ S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU a ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO ₂ / N ₂	Nitrates (NO ₃)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

ONPG : orthonitrophényl-bêta-D-galactopyranoside ; **ADH** : arginine dihydrolase ; **VP** Réaction de Voges-Proskauer ; **LDC** : lysine décarboxylase ; **ODC** : ornithine décarboxylase ; **CIT** : Utilisation du citrate ; **H₂S** : recherche d'une thiosulfate réductase ; **URE** : Hydrolyse de l'urée (uréase) ; **TDA** : recherche d'une Tryptophane désaminase ; **IND** : production d'indole
GEL : Gélatinase ; **GLU**: glucose ; **MAN** : mannitol ; **INO** : inositol ; **SOR** : D-sorbitol ; **RHA** : rhamnose ; **SAC** : Dsaccharose ; **MEL** : melibiose ; **AMY** : amygdaline ; **ARA** : arabinose.

d) Interprétation des résultats

L'identification a été réalisée à l'aide d'un logiciel d'identification (feuille Excel pour l'identification microbienne).

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie Moléculaire des Microorganismes

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Moléculaire des Microorganismes

Titre

Etude de *Cronobacter sakazakii* dans la poudre de lait infantile

Résumé

Le lait infantile est généralement considéré comme étant un produit de bonne qualité microbiologique, sans risque d'altération. Cependant, des agents microbiens peuvent contribuer à modifier ses propriétés qui réduisent sa durée de conservation et par conséquent exposées aux risques de contamination, il est un vecteur potentiel de la transmission de l'espèce pathogène *Cronobacter sakazakii* qui peut occasionner des intoxications chez le consommateur.

L'objectif de ce travail est l'étude morphologique, biochimique et la détermination de la résistance aux antibiotiques de l'espèce *Cronobacter sakazakii* (anciennement *Enterobacter sakazakii*) recherchée. Le genre *Cronobacter* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. Il comprend dix espèces, toutes ces espèces à l'exception de *C. condimenti*, ont été liées à des maladies humaines et peuvent entraîner une série de maladies infectieuses, notamment des infections des voies urinaires, une conjonctivite et une pneumonie.

Devant la crise sanitaire du COVID19, notre étude s'est inspirée des résultats obtenus de la littérature, qui montrent que l'enrichissement dans de l'eau péptonée et l'isolement sur milieux Mac Conkey, VRBG et TSA à 37°C pendant 18 à 24 heures, s'est révélé être une méthode efficace pour l'isolement de l'espèce de *Cronobacter sakazakii* à partir des échantillons de poudre de lait infantile.. Cette espèce présente les caractéristiques suivantes : bacilles à Gram négatif, oxydase -, catalase +, glucose +, mannose +, H₂S -, uréase -, indole-, TDA -, incapable de réduire les nitrates en nitrites, VP -, mannitol +, elle est mobile à 39°C, ONPG +, ADH +, ODC - et utilisent le citrate comme seul source de carbone.

Les souches de *Cronobacter sakazakii* présentent une résistance aux antibiotiques vis-à-vis de l'ampicilline et de l'imipénème, cependant, elle est sensible à la gentamycine, à l'amikacine, au chloramphénicol, à la tétracycline et à la ciprofloxacine.

Mot clés : *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter sakazakii*, isolement, enrichissement, le lait infantile.

Membre du jury :

Président du jury : SEKHRI- ARAFA Nadjoua (M.C. A) –UFM Constantine

Rapporteur : BOUZERAIB Latifa (M.A.A) - UFM Constantine.

Examineurs : CHABBI Rabah (M.A.A) - UFM Constantine.

Préparé par : KHITMI Loudjein

RAMOUL Ghofrane

Année universitaire : 2019 -2020