

République Algérienne Démocr  
Ministère de l'Enseignement Supérieur e



967THV-2



Université de Blida -I-  
Institut des Sciences Vétérinaires



*mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de docteur  
vétérinaire*

## *Thème*

**RECHERCHE DE *LISTERIA*  
*MONOCYTOGENES* DANS UN FROMAGE À  
PATE MOLLE DE TYPE « CAMEMBERT »,  
PRODUIT AU NIVEAU DE LA LAITERIE DE  
BENI-TAMOU**

*Réalisé par*

*Melle Hamida Lynda & Mr. Hamzioui Housseem*

*Soutenu devant le jury*

**Dr BAAZIZE-AMMI. D**

**Maitre Assistante à ISV de Blida**

***Présidente***

**Dr TARZAALI. D**

**Maitre Assistante à ISV de Blida**

***Examinatrice***

**Dr ABDELLAOUI. L**

**Maitre Assistante à ISV de Blida**

***Promotrice***

**Promotion 2015**

## **REMERCIEMENTS**

*En préambule de ce mémoire ; je remercie le dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience pour accomplir ce travail.*

*Nombreux, sont ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.*

*Je tiens à remercier particulièrement :*

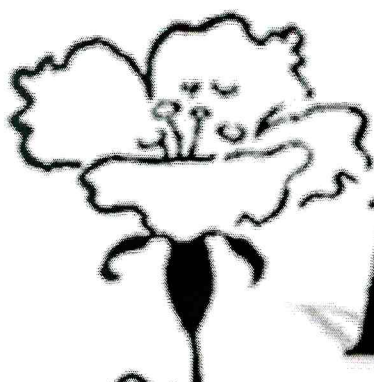
- *Mme ABDELLOUI. L, ma promotrice de m'avoir proposé ce thème, et aussi pour son soutien, son aide, ses conseil, ces orientations et ses encouragements.*
- *Mme BAAZIZ.D, qui ma fait l'honneur de présider ce jury et à qui j'adresse mes sincères gratitudees.*
- *Mme TARZAALI. D, pour l'examination de mon travail. à qui j'adresse mon respect le plus profond.*

*Mes remerciements chaleureuseux vont aussi à :*

*Tout le personnel de l'Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire*

*Au personnel de la laiterie-fromagerie de Beni-Tamou.*

*Mes remerciements sincères s'adressent également aux enseignants qui ont contribués à ma formation*



# *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*  
*Mes chers parents pour leur*  
*soutien et leur réconfort*  
*À Mes Frères et Mes Sœurs,*  
*Et à toute la famille Hamzioui.*  
*À tous mes collègues de la*  
*promotion.*  
*À tous mes amis .*  
*À mon binôme Lynda et sa*  
*famille*

Houssem

# Dédicace

- Avant tout, je me prosterne devant le tout puissant Allah de m'avoir donné la force, la santé et la volonté pour réaliser ce modeste travail que je dédie :

- A la lune qui allume mes nuits, à celui qui a été toujours mon support dans ma vie : mon papa

- Au soleil qui brille mes jours, à celle qui m'a guidé pour faire mes premier pas, qui ma appris mon premier mot, et qui a été mon soutient dans cette vie : ma maman

- Aux trois personnes les plus chères ; ma sœur Wissem et mes deux frères Nabil et Kaki pour qui je souhaite beaucoup de réussite.

- Mes chers grands parents ; mes oncle ; mes tantes et leurs enfants. Touts mes cousins, Toutes mes cousines.

- Monsieur Rebihi Redha et sa femme Farida et leur fille Assia.

- Ma deuxième famille : mon entraîneur de judo Monsieur Hamide Boudoud et tous mes Amis athlètes.

- A tous mes amis surtout : Aïcha, katia, Houda, Farida, Djouher, Hayat, Tinhinane, Fississa, Yassmine et Houda.

- A tous les étudiants de la promotion 2015.

- A mon binôme et sa famille.

Lynda

## Liste des figures

Numéro	Titre	Page
01	Aspect de <i>Listeria monocytogenes</i> au Gram	05
02	Aspect de <i>Listeria monocytogenes</i> sur gélose au sang .	07
03	Schéma de l'infection listérienne	10
04	Représentation schématique des organes touchés au cours de l'infection à <i>L.monocytogenes</i> .	11
05	le Cycle de réplication intracellulaire de <i>Listeria monocytogenes</i>	11
06	Cycle de contamination du lait cru par <i>Listeria</i>	19
07	Matériel biologique	22
08	Plan d'échantillonnages selon ces étapes de fabrication du camembert	24
09	Préparation des échantillons	25
10	Aspect de la réaction de catalase.	30
11	Aspect de <i>Listeria</i> sur gélose mobilité	31
12	Fiche de résultats de l'API.	35
13	Echantillonnage sur différentes étapes de fabrication du Camembert.	42
14	Résultats de la suspicion de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les prélèvements analysés	43
15	Aspect des colonies suspectes de <i>Listeria spp</i> sur gélose Palcam (personnelle)	44
16	Aspect des colonies suspectes de <i>Listeria spp</i> sur gélose Oxford (personnelle)	44
17	Aspect microbiologique de <i>listéria</i> après coloration de Gram <b>(Lebres, 2006).</b>	44
18	Aspect de <i>listéria</i> sur gélose Mannitol mobilité à 25 °C	45

### Liste des tableaux

Tableau n°	Titre	Page
1	Temps de génération de <i>Listeria monocytogène</i>	6
2	Croissance de <i>listeria monocytogenes</i> sur trypticase boy broth	7
3	Caractères d'identification du genre <i>Listeria</i>	8
4	Nombre des échantillons de chaque étape de fabrication	23
5	Lecture et Interprétation des caractères portés sur la galerie	37
6	Répartition des prélèvements sur les 3 productions	42
7	Résultat de la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	43

## *Liste des abréviations*

- ADN** : Acide **D**éoxyribo **N**ucleïque
- AFSSA** : **A**gence **F**rançaise de **S**écurité **S**anitaire des **A**liments
- API** : **A**lytic **P**rophylactic **I**ndex.
- AW** : **A**ctivité de l'eau
- C** : **C**elsius.
- CAMP** : **C**hristie, **A**tkins, **M**unch, **P**etersen
- DIM** : **D**ose **I**nfectieuse **M**inimal.
- DLC** : **D**ate **L**imite de **C**onsommation
- FDA** : **F**ood and **D**rugs **A**ministrarion
- g** : **g**ramme.
- GN** : **G**élose **N**utritive.
- h** : **h**eur.
- HACCP** : **H**azard **A**nalysis **C**ritical **C**ontrol **P**oint
- HIDAOA**: **H**ygène et **I**nspction des **D**enrées **A**limentaire d'**O**rigine **A**nimale.
- ISO** : **I**nternational for **S**tandardisation **O**rganisation
- LLO** : **L**a **L**isteriolisine **O**
- Na Cl** : **C**hlorure de **S**odium.
- PALCAM** : **P**olymixine **B**, **A**cridlavine, **L**ithium-chlorid, **C**eftazidine, **e**sculine, **D**-**M**anitol.
- PCR** : **P**olymerase **C**hain **R**eaction
- PH** : **P**otentiel **H**ydrogène.
- RM** : **R**ouge de **M**éthyl

**RTE** : Ready To Eat.  
**SPP** : Species Plurial  
**TDA** : Tryptophane Désaminase.  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Nérosis Factor  $\alpha$ .  
**TSA** : Trypto-caséine soja  
**TSAYE** : Tryptone Soja Agar Yeast Extract  
**TSI** : Three Sugar Iron  
**UFC** : Unité Formant Colonie  
**UI** : Unité International.  
**USAD** : United States Drug Administration  
**VP** : Voges Proskauer  
**%** : Pourcentage.



## Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Partie 1 : Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités.....</b>	<b>3</b>
I.1. Historique.....	3
I.2. Caractères biologiques.....	4
I.3. Caractère culturaux.....	5
I.4. Caractère biochimiques.....	8
<b>Chapitre II : Listériose Clinique.....</b>	<b>9</b>
II-1 : Pouvoir pathogène et virulence.....	9
II-2 : Mécanisme d'infection.....	9
II-3 : dose infectante minimale.....	11
II-4. La <i>listériose materno-infantile : listériose humaine</i> .....	12
II-5 : Diagnostic.....	10
II-6 : Traitement.....	13
II-7 : Prévention.....	14
<b>Chapitre III : Listéria et Fromages.....</b>	<b>15</b>
III-1 : Définition des fromages.....	15
III-2 : Définition camembert.....	16
III-3 : Listéria monocytogenes et denrées alimentaires.....	17
III-4 : Reglementation.....	20
<b>Partie II : Partie expérimentale.....</b>	<b>22</b>
<b>I : Matériel.....</b>	<b>22</b>
<b>I-1 : Matériel de laboratoire.....</b>	<b>22</b>

I-2 : Matériels biologiques.....	23
<b>II : Méthode .....</b>	<b>25</b>
II-1: Méthode d'analyse qualitative.....	25
II-2 : Méthode d'analyse quantitative.....	37
II-3 : Expression des résultats.....	39
<b>III. Résultats et Discussion.....</b>	<b>42</b>
III-1 : Résultats de prélèvement.....	42
III-2 : Identification du genre .....	43
III-3 : Identification de l'espèce.....	45
III-4 : Résultats de dénombrement.....	45
VI : Discussion.....	47
<b>Conclusion .....</b>	<b>49</b>
<b>Recommandation.....</b>	<b>50</b>
<b>Références bibliographique</b>	
<b>Annexes</b>	

## Résumé

*Listeria monocytogenes* est retrouvée dans environ 10 % des aliments, particulièrement dans les charcuteries, les viandes hachées, poissons fumés, et les fromages à pâte molle.

Nous avons recherché *Listeria monocytogenes* dans 70 échantillons prélevés sur différentes étapes de la chaîne de production du fromage de type camembert depuis le lait de vache cru jusqu'au produit fini au niveau de la laiterie de Beni-tamou.

L'absence totale des *Listeria monocytogenes* constatée durant notre travail peut être expliquée par plusieurs facteurs à savoir : la présence des moyens de défenses naturelle dans le lait, l'absence de l'utilisation de l'ensilage dans l'alimentation des vaches qui aurait probablement contribué à l'absence de l'infection, et aussi grâce à l'application rigoureuse du système HACCP mis en place au niveau de la laiterie depuis le lait cru (élevages) jusqu'au produit fini (laiterie).

**Mots clés :** *Listeria monocytogenes*, lait cru, fromage à pâte molle, camembert.

## Summary

*Listeria monocytogenes* is found in approximately 10 % of food, particularly in the meats in the meats chopped, fish, and soft cheeses.

We searched for *Listeria monocytogenes* in 70 samples from different stages of the type of cheese production chain camembert from raw cow's milk to the finished product at the dairy Beni tamou.

The total absence of *Listeria monocytogenes* noted during our work can be explained by several factors with knowing: the presence of means of defence in milk, the absence of the use of the ensilage in the food of the cows which would have probably contributed to the absence of the infection, and also thanks to the rigorous application of system HACCP system implemented at the dairy for raw milk (farms) to the product put on the market (dairy).

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, raw milk, soft cheese, Camembert cheese.

## الملخص

توجد الليستيريا مونوسيتوجيناس في حوالي 10% من المواد الغذائية, خاصة اللحوم و اللحوم المفرومة, السمك و الأجبان الطرية.

بحثنا عن الليستيريا مونوسيتوجيناس في 70 عينة من مراحل مختلفة من إنتاج الجبن نوع "كاممبير" انطلاقا من حليب البقر الطازج إلى غاية المنتج النهائي في ملبنة بني تامو.

لليستيريا التي لوحظت خلال عملنا يمكن تفسيرها من خلال عدة عوامل: منها وجود طبيعي لعوامل الدفاع في الحليب, عدم استخدام الأنسلاج في النظام الغذائي للأبقار الذي ساهم بشكل

كبير في غياب الإصابة أيضا, و من خلال التطبيق الصارم لنظام HACCP خلال جميع مراحل الإنتاج

انطلاقا من الحليب الطازج (المزارع) إلى غاية المنتج الذي يطرح في الأسواق.

كلمات البحث : الليستيريا مونوسيتوجيناس, الأجبان الطرية, الحليب الطازج, كاممبير.

## Introduction

L'industrie alimentaire est continuellement exposée au risque de contamination par des germes qui peuvent être dangereux pour la santé publique. Parmi ces germes nous pouvons citer le genre *Listeria*.

*Listeria monocytogenes* est l'espèce pathogène chez l'homme ainsi que chez l'animal. Ce germe est resté longtemps ignoré par les médecins et les scientifiques jusqu'au 1981, date à laquelle elle fut mise en évidence. Elle est responsable de la listériose qui est une maladie émergente, rare, mais grave, cliniquement la maladie se manifeste par des méningites, septicémie et infections néonatales et s'avère particulièrement dangereuse pour les femmes enceintes, les nouveaux nés et les patients immunodéprimés. Elle est surtout sporadique mais des flambées épidémiques plus ou moins importantes liées à la consommation d'aliments contaminés ont été observées ces dernières décennies.

Ce petit bacille à Gram positif, aéro-anaérobie facultatif, ubiquitaire et résistant aux conditions extérieures se transmet essentiellement à l'homme par voie digestive par le biais des aliments (lait et dérivés, viandes et produit carnés), et se transmet par le biais des ensilages aux animaux, ce qui, en médecine vétérinaire lui attribue le nom de « la maladie de l'ensilage ».

De ce fait la *Listeria monocytogenes* est au centre des préoccupations à la fois des industriels de l'agroalimentaire et des microbiologiques des aliments. La détection des *Listeria* reste une préoccupation majeure pour les laboratoires de contrôle avec la mise en place de stratégies propres à chaque pays.

En Algérie l'arrêté du 24 janvier 1998 a retenu l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25ml de lait cru, et sur un grand nombre de produits alimentaires prêts à être consommés, l'arrêté du 25 septembre 2005 rend **obligatoire** la recherche de *listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

Comme dans de nombreux pays, la situation est difficile à évaluer car la listériose n'est pas encore considérée comme une menace pour la santé publique et ne figure dans la liste des maladies à déclaration obligatoire (Lebres, 2006). Cependant, même si à notre connaissance aucune épidémie n'a encore été signalée jusqu'à présent, la présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments ne peut être ignorée.

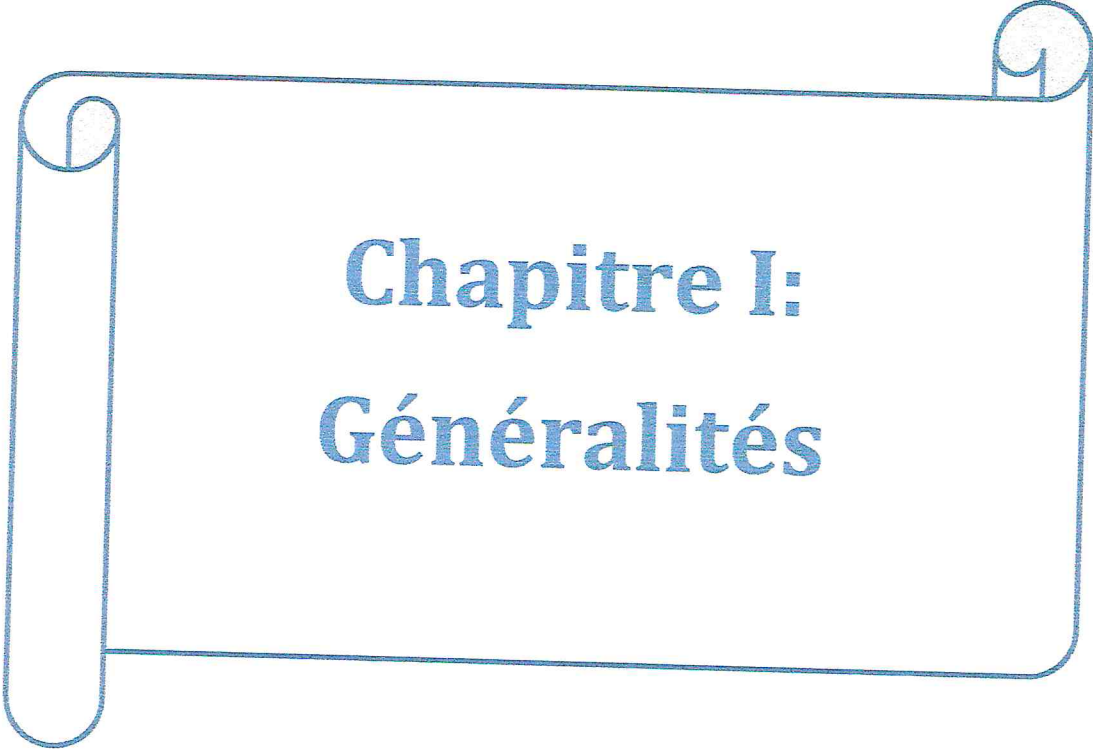
Dans notre présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche, l'identification et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans un produit laitier « Fromage à pâte molle - de type Camembert » tout au long du procès de sa fabrication, pour voir l'évaluation de la contamination en s'appuyant sur une méthode normalisée et validée par ISO.

Dans le présent travail nous commençons par quelques rappels bibliographiques, puis nous détaillons le matériel utilisé et les différentes méthodes appliquées dans notre étude et enfin, nous exposons et discutons les principaux résultats obtenus.



**Partie I : Partie  
bibliographique**





**Chapitre I:  
Généralités**

## I-1. Historique

La découverte de *Listeria* est liée à des cas de listériose humaines et animales étudiés au début du XX siècle. En 1918, **Dumont** et **Cotoni** isolèrent une bactérie du liquide céphalo-rachidien d'un soldat atteint de méningite (**Sautra et al. 1998, Moll et Moll, 2002**).

En 1926, **Murray -Webb et Swann**, isolèrent un petit bacille à gram positif du sang de lapins atteints d'une mononucléose sanguine, et fournirent une description détaillée du germe qu'ils nommèrent *Bacterium monocytogenes* puis renommé *Listerilla hepatolytica* par **Pirie** en 1927 (**Le Minor et Verron, 1990, Jacquet, 1998**). Le nom officiellement admis en 1940 pour cette bactérie est *Listeria monocytogenes* (**Sutra et al. 1998**).

A partir de 1951, des auteurs allemands décrivent la forme septicémique du nouveau-né, et les travaux de Seeliger en 1966 montrent que *Listeria monocytogenes* joue un rôle assez important en pathologie humaine. En 1981, la transmission alimentaire chez l'homme fut prouvée lors d'une épidémie au Canada. Depuis cette date, *Listeria monocytogenes* fut l'objet d'études et de surveillances épidémiologiques d'origine alimentaire. (**Sautra et al. 1998, Rocourt, 1996, Recourt et al, 1999**).

### En Algérie :

-En 1989, **Benallegue et al**, isolèrent pour la première fois la bactérie lors d'un cas de méningite (**Lebres, 2002**).

-En 1989, **Bellouni et al** isolèrent 11 souches de *Listeria* à partir de 87 placentas de bovins et une autre souche de *Listeria* à partir de 16 fromages analysés.

-En 2000 **Lebres et al**, isolèrent 10 souches de *Listeria* sur 419 échantillons de denrées alimentaires autres que le lait, dont 7 *Listeria monocytogenes*, 3 *Listeria innocua* (**Lebres, 2002 et Lebres 2006**). En 2004, **Lebres et al** isolèrent, 28 souches de *Listeria* à partir de lait cru.

-En 2007, **Hamdi et al**, isolèrent à partir de lait cru, de lactosérum et du caillé la *Listeria monocytogenes*, 4 souches de *Listeria* sur 153 échantillons de lait de ferme et 6 sur 80 échantillons de citernes testés positifs pour *L.monocytogenes*, Tous les échantillons de sérum et de lait caillé ont été testés négatifs pour *L.monocytogenes*, mais 2 sur 22 échantillons de sérum ont été contaminés par *L.innocua*.

En 2012, Bouayad et Hamdi, isolèrent sur 227 échantillons (aliments prêt à manger commercialisé sur Alger) ,21 ont été testés positifs pour *Listeria spp*, parmi eux ,6 ont été testés positifs pour *L. monocytogenes*.

## I-2 Caractère biologique :

### I-2-1.Taxonomie :

D'après le **Bergey 's manuel, volume 2 (1986)** les listeria sont des bacilles à Gram positif, réguliers, non sporulant, elles appartiennent à la section qui regroupe les genres *Lactobacillus*, *Erispelathix*, *Brochotherix*, *Kurthia*, *Caryophanon*.

Le genre listeria appartient à la branche phylogénitique, *des Clostridium* , *Staphylococcus* , *streptococcus* , *Lactobacillus* , *Brochotherix* , *bacillus* , les listeria et les brochotherix font partie des listericeae (**Larpen,2000**).

Actuellement six espèces sont donc reconnues dans ce genre, en plus de *Listeria monocytogenes*, il s'agit de :

- *Listeria grayi* qui a été découverte en 1966 par Larsen et Seeliger
- *Listeria murrayi* qui a été découverte en 1971 par Welshimer et Meredith
- *Listeria ivanovii* qui a été découverte en 1984 par le microbiologiste bulgare Ivanov
- *Listeria innocua* qui a été découverte en 1981 par Seeliger
- *Listeria seeligeri* et *Listeria welshimeri* qui ont été mises en évidence en 1982

En 1992, **Rocourt et al.** confirment l'existence de fortes similitudes génomiques entre *Listeria grayi* et *Listeria murrayi* et proposent de réunir ces deux taxons en une unique espèce qui, en raison des règles de priorité, doit être dénommée *Listeria grayi*.

Classification phylogénique des listeria selon (**Dellaras, 2007**) :

**Domaine :** Bacteria

**Phylum :** Firmicutes

**Classe :** Bacilli

**Ordre :** Bacillales

**Famille :** Listeriaceae

**Genre :** Listeria

### I-2-2. Caractères morphologiques :

*Listeria spp.*, se présentent sous la forme de petits bacilles droits, de 0,4 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 0,5 à 2,5  $\mu\text{m}$  de longueur, aux extrémités arrondies **Zaïka et Fanelli, (2003)**. Elles se présentent de manière isolées ou groupées en V ou en L ou en palissades ou, parfois en courtes chaînes ou en petits amas. Elles sont des bactéries non acido-alcooloresistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobie facultative mais cultivant mieux en aérobie et mobile lorsqu'elles sont cultivées à 20 °C (ciliature péritriche). Immobiles à 37°C

Dans des cultures plus âgées, *Listeria* prend un aspect plus allongé, filamenteux, et la coloration de gram prend mal. (Figure 1)



Figure 1 : Aspect de *Listeria monocytogenes* au Gram (**Lebres, 2002**)

### I-3. Caractères culturels :

Les *Listeria* sont aéro-anaérobie facultatifs, des atmosphères à tension légèrement abaissée en  $\text{O}_2$  et augmentée en  $\text{CO}_2$  par rapport à celle de l'air donnent des cultures plus abondantes.

La *Listeria* se développe à des températures allant de 1 à 45°C. C'est un germe psychrotrophe, c'est-à-dire qu'il a la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7°C, indépendamment de sa température optimale de croissance (**Portalier, 2002**).

Le genre *Listeria* n'est pas un genre exigeant, il se développe sur tous les milieux usuels en 24-48h. Sur gélose nutritive, les *Listeria* forment des colonies de faible diamètre (<1,5mm), lisses, transparentes, légèrement convexes et à bords réguliers. Eclairées par une lumière oblique, les colonies ont une légère coloration bleu vert.

### 1-3-1. Température et croissance

La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. La bactérie peut même se développer à des températures comprises entre -2°C et +45°C (Augustin, 1999). Ces données montrent clairement que si un taux de croissance positif est détecté à des températures inférieures à 0°C, celui-ci est extrêmement faible, et la croissance n'est observable que pour de longues périodes d'incubation. Par ailleurs, une forte hétérogénéité des taux de croissance a été décrite (Augustin, 1999). Plus généralement le comportement de *L. monocytogenes* semble souche-dépendant quelque soit les facteurs étudiés (température, pH, aw), les aliments (laits, fromages, etc....) (voir tableau 1).

Tableau 1: Temps de génération de *Listeria monocytogène* (Ryse et Marth, 1991)

produits	Temps de génération (en h) à				
	4°C	8°C	13°C	21°C	35°C
Lait entier	33,27	13,06	5,82	1,86	0,692
Lait écrémé	34,52	12,49	6,03	1,92	0,693
Lait chocolaté	33,46	10,56	5,16	1,72	0,678
Crème à fouetter	36,30	11,93	5,56	1,80	0,683

### 1-3-2. pH et croissance :

*Listeria monocytogenes* peut se développer dans une plage de pH variant de 5,6 à 9,6. Son pH optimal est aux alentours de 7 avec une tendance plutôt alcaline. Des études ont néanmoins prouvé que la *Listeria monocytogenes* commence à se développer à des pH inférieurs à 5,6 mais la tolérance à ces pH est plus faible qu'aux pH basiques. Cependant, la *Listeria* survit jusqu'à pH 3,26. (Nickalus, 2001).

La croissance de *Listeria monocytogenes* à des pH bas est directement liée à la température (tableau 2) (Larpen, 2004).

**Tableau 2** : Croissance de *listeria monocytogenes* sur trypticase boy broth (Larpent, 2004)

T°C d'incubation	pH minimal de croissance
30	4.39 - 4.63
20	4.39 - 4.62
10	4.62 - 5.05
7	4.62 - 5.05
4	5.23 - 5.45

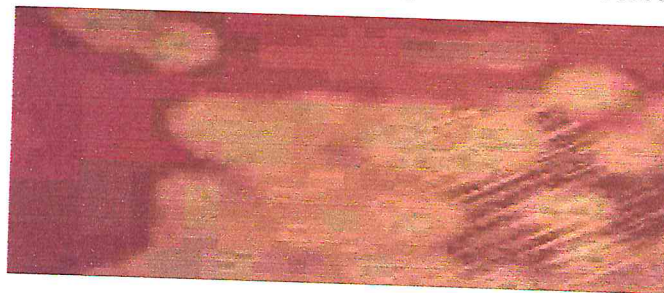
**I- 3- 3. Aw et croissance :**

*Listeria* se développe à un optimum d' aw de 0,97, mais peut se développer à 0,943. Une Aw inférieure à 0,932 ne semble pas permettre la croissance de la dite bactérie (Skovgaard, 1988). La bactérie survit au moins 132 jours à 4°C en milieu «Trypticase Soy Agar» avec 25% de Chlorure de Sodium (NaCl), donc un aw de 0.83. Il a été observé que *L monocytogenes* peut survivre pendant au moins 84 jours à 4°C dans un salami fermenté dont l'aw est de 0.79-0.86 (Johnson, et al, 1988).

**I-3- 4.Sel et croissance :**

Certains travaux ont montré que la *Listeria monocytogenes* peut survivre 132 jours en supportant une teneur de 25,5% de Na Cl sur un milieu au tryptose et à 4°C .Il a été cependant démontré qu'à 37°C, la survie dans les mêmes conditions est réduite à 5jours .Ce qui montre l'influence énorme qu'à la température sur la sensibilité du germe au NaCl. Une combinaison de pH=5 et 6% de Na Cl inhibent cette espèce. (Larpent, 2000 et Nicklaus, 2001).

L'hémolyse peut être renforcée en recourant au test de CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen). *Listeria monocytogenes* et *Listeria seeligeri* donnent un CAMP test positif vis-à-vis d'une souche de *Staphylococcus aureus* substance productrice de bêta lysine.

**Figure 2** : Aspect de *Listeria monocytogènes* sur gélose au sang (Veronique P , 2002)

**I-4. Caractères biochimiques :**

*Listeria monocytogenes* est catalase positive, oxydase négative. Cette bactérie fermente le glucose, le lévulose, le maltose sans production du gaz. Elle hydrolyse l'esculine. Elle n'attaque ni l'urée, ni les nitrate, et n'est pas protéolytique. Elle ne produit pas l'indole, ni H<sub>2</sub>S elle est phosphatase alcaline positive. Les réactions de rouge de méthyle et de Voges-Proskauer (production d'acétone) sont toutes deux positives.

La caractérisation phénotypique de *Listeria monocytogenes* suit donc une méthode classique : bacille à Gram positive, catalase positive, oxydase négative, mobilité à 20°C, β-hémolyse sur gélose au sang, nitrate réductase négative, hydrolyse de l'esculine, indole négative, uréase négative, H<sub>2</sub>S négative, D-xylose négative, D-mannitol, L-rhamnose positive (Jacquet et al, 1993 ; Larpent, 2004) (voire tableau 3)

**Tableau 3:** caractères d'identification du genre *Listeria* (Jacquet et al, 1993 ; Larpent, 2004)

Réaction positives	Réactions négatives
Coloration de Gram	Oxydase
Catalase	Gaz en glucose
Glucose	Uréase
VP, RM	Indole
Esculine	Gélatinase
Aéro-anaérobie facultatif	H <sub>2</sub> S
Réduction du lait tournesolé	Sporulation
Production d'acide à partir de sucre dont glucose	
Mobilité à 24h	



**Chapitre II:  
Clinique de la  
Listériose**



## II-1. Pouvoir pathogène et virulence :

### II-1-1. Pouvoir pathogène :

Parmi les espèces de *Listeria*, seules 3 (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*) peuvent provoquer des infections humaines ou animales (**Larpent, 2004**).

*Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène opportuniste responsable de la listériose. Cette pathologie est commune à l'homme et l'animal.

La listériose évolue essentiellement sous forme de cas sporadiques, pour lesquels il est très difficile de déterminer l'origine, elle est diagnostiquée principalement dans les pays industrialisés (**Larpent, 2004**).

## II-2. Mécanisme d'infection :

Trois modes de contamination par *Listeria monocytogenes* ont été identifiés :

- Le contact direct avec l'animal, très rare pouvant être observé pour le vétérinaire lors d'intervention obstétricale chez les animaux infectés.
- Les infections nosocomiales, rares.
- La transmission alimentaire (très fréquente).

Chez l'homme, la voie de pénétration de cette bactérie est localisée dans la voies aériennes supérieures (angines, pharyngite, infection pseudo grippales) et au niveau du tube digestif après absorption d'aliments contaminés (**Larpent, 2004**).

Le mode de contamination dominant est donc alimentaire avec atteinte du tube digestif puis d'autres organes ou tissus en plusieurs étapes : après ingestion d'aliments contaminés (**Farber et Peterkin, 1991**), les *Listeria* traversent l'intestin pour atteindre la circulation sanguine, ensuite elles sont captées essentiellement par le foie et se disséminent dans le système nerveux central ou le placenta (voire figure 3).

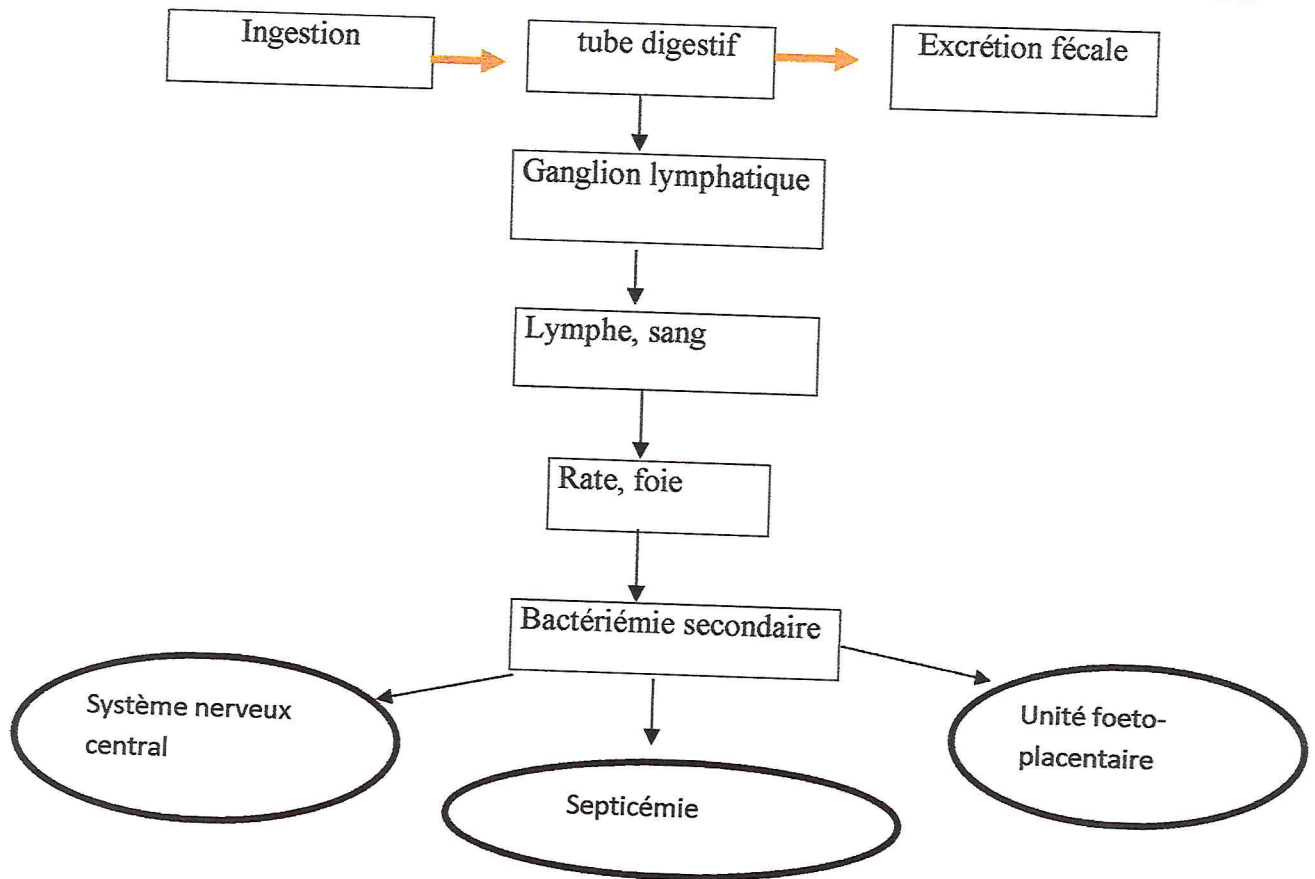


Figure 3 : Schéma de l'infection listérienne (Federighi, 2005).

A l'échelle de la cellule *Listeria monocytogenes* se comporte comme un parasite intracellulaire facultatif qui est capable de survivre à l'extérieur de l'hôte mais aussi de pénétrer dans les cellules eucaryotes de s'y multiplier et de passer directement d'une cellule à l'autre. Ce processus intracellulaire peut être décomposé en 4 phases :

- ✚ **L'internalisation** : *Listeria monocytogenes* produit des internalines qui sont indispensables à l'invasion cellulaire, les *Listeria* adhèrent à des cellules non phagocytaires (entérocytes, hépatocytes, fibroblastes, cellules épithéliales) puis pénètrent en induisant leur propre phagocytose (Jacquet et al, 2002).
- ✚ **Sortie de la vacuole intracellulaire** : les bactéries internalisées quittent les vacuoles de la phagocytose pour gagner le cytoplasme. la listériolysine O (LLO) : exotoxine codée par le gène *hly*, intervient lors de la lyse de la vacuole ; elle est responsable du pouvoir hémolytique observé in vitro sur gélose de sang de mouton

- ✦ **Nucléation des filaments d'actine** : l'actine A produite par *Listeria* a permis le contact avec les filaments d'actine de la cellule hôte, de rejoindre la membrane plasmique et de former une évagination de cette membrane qui sera phagocytée par la cellule voisine (Kocks et al, 1992).
- ✦ **Propagation aux cellules voisines** : une phospholipase et une lécithinase favorisent la propagation aux cellules voisines (Fig 4 et Fig 5) (Moll et Moll, 2002 ; Larpent, 2004 et Federighi, 2005).

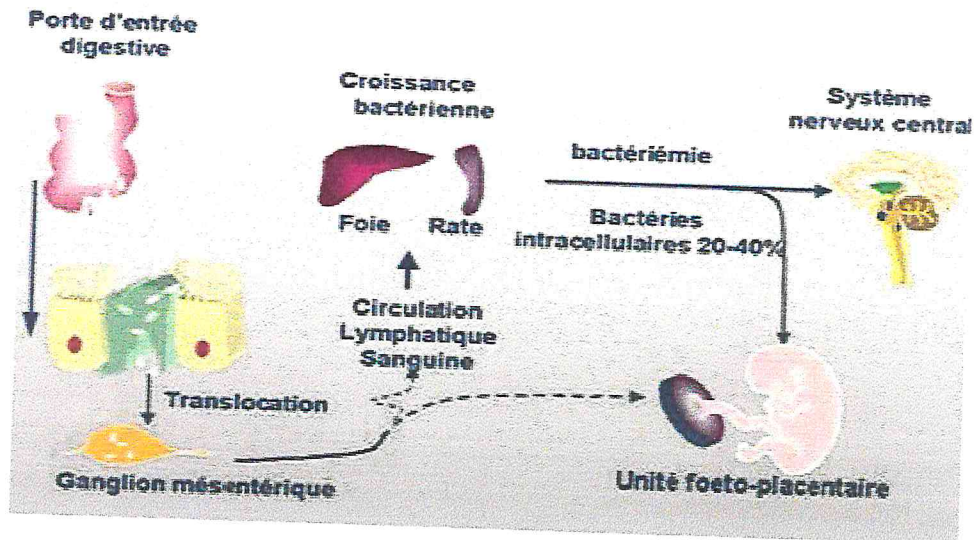


Figure 4 : Représentation schématique des organes touchés au cours de l'infection à *L.monocytogenes* (Berche, 2002)

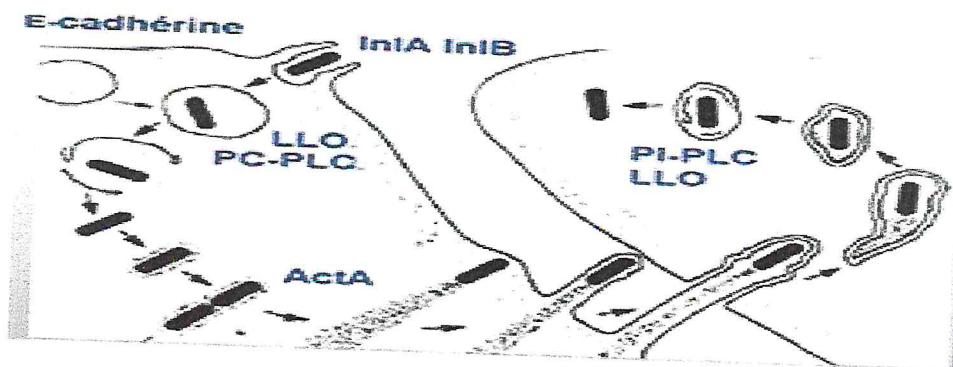


Figure 5: le Cycle de réplication intracellulaire de *Listeria monocytogenes* (Cossart,et al,2003)

### II-3.Dose infectieuse minimale(DIM) :

Pour certaines bactéries pathogènes, la dose minimale infectieuse est bien déterminée, mais pour *Listeria monocytogenes* la dose capable de causer une incidence donnée d'infection est méconnue dans la mesure où l'infection peut demeurer asymptomatique (Federighi, 2005 et Lebres 2006).

Les numérations effectuées sur les produits à l'origine de cas cliniques indiquent que cette dose est supérieur à 100 *Listeria monocytogenes* /g ou / ml ingéré (Federighi, 2005).

#### II-4. La listériose materno-infantile : listériose humaine

##### ➤ Chez la femme enceinte

Les femmes enceintes présentent le plus souvent une maladie inapparente révélée par l'infection de l'enfant. Elle se manifeste par un syndrome pseudo-grippal ou syndrome fébrile, une pharyngite ou une diarrhée banale, l'infection transplacentaire peut entraîner un avortement, mort fœtale et un accouchement prématuré d'un enfant infecté (Avril et al, 2002 et Larpent, 2004 et Federighi, 2005).

##### ➤ Chez le nouveau-né :

Les nouveau-nés des mères infectées, pourront être contaminés le plus souvent par voie sanguine « in utéro » ou à partir d'un foyer endométrique secondaire au moment du partum.

Quelques heures après la naissance on observe le plus souvent des septicémies, hépatosplénomégalies, ictère et éruption (granulomatose septique infantile), associée dans 2/3 des cas à une méningite (Larpent, 2004 ; Bille, 1997).

##### ➤ La listériose de l'adulte :

Les *Listéria* sont surtout virulentes chez des personnes à risques : personnes âgées cancéreux, greffés, immunodéprimés. La sensibilité à *listéria monocytogenes* est augmentée par le diabète, les maladies hépatiques ou rénales, la diminution gastrique, la dépendance aux narcotiques et au tabac. Les surcharges en fer favorisent également la maladie. (Larpent, 2004 ; Roucourt, 1998).

Chez l'adulte, 30-50 % présente une listériose méningique. D'autres atteintes du système nerveux central sont décrites, comme les méningo-encéphalites et les abcès du tronc cérébral et de la moelle osseuse (Bourgeois et al. 1996 et Larpent, 2004).

##### ➤ Chez les animaux : listériose animale

La listériose est très fréquente et touche tous les genres et les espèces. Les infections sont très proches de celles observées chez l'homme (septicémie, méningo-encéphalite et avortement) (Larpent, 2004).

En ce qui concerne la *listériose* animale, notamment chez les ruminants, il semble que les cas de *listériose* recensés sont plus fréquents en hiver et au printemps et sont corrélés positivement à une ingestion plus importante d'ensilage (Watkins et Sleath, 1981).

Chez les bovins, on estime à 1,8 % le taux d'avortement dû à *listéria*. (Cottin et al, 1986). Ont observé la présence de *listéria* dans respectivement 27%, et 6,6% des placentas des bovins ayant avorté.

Une vache sur mille est excrétrice de *listéria* par la mamelle, en l'absence de signes cliniques, ou tout au plus lors d'une mammite subclinique avec augmentation du taux cellulaires

Selon le rapport de l'AFSSA (2006), les résultats des investigations sur le portage et l'excrétion mammaire de *listéria monocytogènes* sont d'une grande variabilité. Le portage peut aller de 0.01% jusqu'à 5 voire 18 à 20% lors de contrôles successifs et systématiques sur des laits de vaches, de brebis ou de chèvres apparemment saines.

#### II-5. Diagnostic :

Les symptômes de la listériose n'étant pas spécifiques, le diagnostic bactériologique repose sur l'isolement et l'identification de *listeria monocytogenes* à partir des produits pathologiques

##### II-5-1. Diagnostic bactériologiques :

**Prélèvements chez la mère :** au cours de la grossesse.

**Prélèvements chez le nouveau-né :** isolement facile à partir du sang et du liquide céphalo-rachidien

##### II-5-2. Diagnostic sérologique :

C'est la détection d'anticorps contre les bactéries tuées (séroagglutination) ou contre la listériolysine (Gaillard et al, 2004).

#### II-6. Traitement :

Le traitement de choix d'une listériose neuroméningée est fondé sur l'association ampicilline-aminoside. Chez l'adulte, l'ampicilline est administrée par voie veineuse à la dose de 200 mg /jours pendant les premiers jours de l'infection. La pénicilline G à la dose de 300 000 unités internationales (UI) kg/jour peut remplacer l'ampicilline chez les adultes. La

gentamicine, associée à l'ampicilline, est administrée par voie musculaire ou veineuse à fortes doses (3-6 mg/kg/jour). La durée du traitement est de 3-4 semaines du fait de la possibilité de rechutes en cas de traitement trop court, surtout chez les sujets immunodéprimés. Si une listériose est suspectée et diagnostiquée par les hémocultures chez les femmes enceintes, le traitement repose sur l'ampicilline (6g/jour) par voie veineuse pendant trois semaines.

En cas d'allergie aux pénicillines, le triméthoprime-sulfaméthoxazole, associé à la gentamicine, donne de bons résultats (Pinède et al, 1993). D'après Blanot et al, (1999).

Les modèles expérimentaux confirment que les antibiotiques les plus efficaces sont l'ampicilline et le triméthoprime-sulfaméthoxazole.

### II-7. Prévention :

La prévention pour les personnes à risque c'est-à-dire les femmes enceintes, les personnes âgées, les personnes immunodéprimées par un traitement immunosuppresseur ou par pathologie telle que le cancer, cirrhose, consiste à éviter la consommation des produits reconnus potentiellement dangereux tels que : charcuterie en gelée, les pâtés, le foie gras, les fromages au lait cru (camembert), les poissons fumés, les coquillages crus, surimi, tarama, graines germées crues et la liste n'est pas exhaustive

Devant tout épisode fébrile chez la femme enceinte il faut demander une hémoculture et commencer une antibiothérapie.

Il faut éviter, pour les femmes enceintes, la manipulation d'animaux à risque (rongeurs, ruminants, oiseaux) sinon après manipulation des animaux, une hygiène rigoureuse doit être respectée.

Des mesures d'hygiène et des contrôles bactériologiques pour les aliments destinés à être consommés crus doivent être appliqués (Euzéby, 2000)



**Chapitre III:**  
**Listeria et fromage**

### III-1. Définition du fromage

Le fromage est un produit laitier, obtenu à partir de la coagulation du lait par un ensemble d'enzyme coagulants, connu sous le nom de présure, suivie de l'élimination partielle du lactosérum (égouttage), ce qui laisse subsister un caillé, lequel est à l'origine du fromage. C'est un aliment riche en calcium fabriqué à partir de lait de vache principalement mais aussi de brebis, de chèvre, de bufflonne. Le mot fromage vient du latin « formaticus » signifiant qu'il est fabriqué dans une forme appelée moule de fromage (Eck et Gillis, 1997).

Il y'a plusieurs types de fromages, et l'élément principale qui permet de classifier les fromages est leur croûte (Majdi, 2009).

#### III -1-1. Pâtes molles

Les fromages à pâtes molles ont une texture généralement crémeuse et onctueuse avec une légère élasticité dans la pâte. Les pâtes molles contiennent entre 50% et 60% d'humidité. Ce type de fromage se divise en deux catégories : les pâtes molles à croûte fleurie et naturelle et les pâtes molles à croûte lavé. Ils sont fabriqués à partir de lait pasteurisé ou de lait cru de chèvre, de vache ou de brebis

- **Fromage de pâte molle à croûte fleurie** : Il se caractérise par une croûte blanche à dorée recouverte d'un duvet de moisissures blanc et feutré appelé fleur qui se développe pendant l'affinage ce qui leur donne le nom <croûte fleurie>. Ces aspect duveteux de la croûte est dû à la présence du champignon *penicillium candidum* qui peut être pulvérisé à la surface des fromages en début d'affinage (Pradal, 2012).
- **Fromage de pâte molle à croûte lavée** : Le principe de fabrication d'une pâte molle à croûte lavée est semblable à celui des pâtes molles à croûte fleurie, sauf que le caillé est coupé plus ou moins finement avant d'être mis en moule.

Ce « rompage » facilite l'écoulement du petit lait : la pâte sera plus serrée, plus compacte mais néanmoins moelleuse, coulante ou plus ferme, selon le degré de séchage. Durant l'affinage, qui s'étend sur deux à quatre mois, le fromage est retourné régulièrement puis brossé ou lavé à l'aide d'une saumure additionné de bière, d'hydromel, de vin ou d'eau de vie, ce qui contribue à l'élaboration de ses diverses caractéristique. Il révèle des saveurs marquées ou prononcées, parfois fortes (Anonyme 1, 1999).



### III -1-2. Pâtes à moisissures interne (persillées) :

Appartiennent à cette famille bleue d'Auvergne, Roquefort... tous fabriqués à partir de lait de vache, sauf le roquefort (exclusivement avec du lait de brebis). Ces fromages sont à l'origine des pâtes molles, que l'on broie, sale et on lesensemence de penicillium.

### III -1-3. Pâtes pressées :

Comme la plupart des fromages, ils font l'objet d'une fermentation lactique, à laquelle s'ajoutent des fermentations complémentaires. L'égouttage est effectué mécaniquement.

- **Fromages à pâte pressée non cuite :**

Ils sont obtenus par l'égouttage sous presse, de fromage à caillé divisé, non réchauffé. Les tomates de Savoie, Sait Nectaire, Reblochon, sont considérées comme des pâtes pressées.

- **Fromages à pâte pressée cuite**

La cuisson s'explique par le fait que le caillé (divisé) est réchauffé dans le petit lait à température rehaussée. C'est le cas du gruyère, de la Mimolette, de la raclette, l'Emmental....

### III -1-4. Pâtes fondues :

Ce sont généralement des fromages industriels, obtenus par la cuisson de fromages auxquels on ajoute des produits laitiers (lait, crème fraîche, beurre...).

### III-2. Définition du camembert :

Selon Veisseyre (1975), le *Camembert* est défini comme étant un fromage à pâte molle, à caillé non divisé en forme de cylindre plat. Il a un diamètre de 10 à 11 cm et une épaisseur de 3 cm. Il renferme au moins 40 % de matière grasse et 110 g de matière sèche. C'est un fromage affiné à moisissures superficielles, originaire de Normandie.

#### III.2.1. Etapes de fabrication du camembert :

La transformation du lait en fromage comporte en général trois étapes (Eck et Gillis, 1997) :

-**La coagulation** : modification physicochimique des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) d'acide lactique.

-**L'égouttage** : séparation d'une partie du lactosérum. Après rupture mécanique du coagulum par moulage et dans certains cas, pression, il conduit à l'obtention du caillé ;

-L'affinage : transformation biochimique des constituants du caillé sous l'action d'enzymes, pour la plupart d'origine microbienne.

Dans la plupart des fabrications, entre l'étape d'égouttage et celle d'affinage, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par réglage de l'activité de l'eau.

les paramètres technologiques mis en œuvre au niveau de ces trois étapes, donnent une très grande variété de fromage. La texture, la saveur et l'arôme du produit sont étroitement liés à la composition (teneur en eau, protéine, matière grasse, minéraux) et au pH du caillé ainsi qu'aux conditions d'affinage ; les caractéristiques du caillé dépendent elles mêmes de celles du coagulum mais aussi de la nature et de l'intensité du travail mécanique, du pH auquel il est effectué et de la vitesse d'égouttage ; les propriétés rhéologiques du gel varient selon les conditions de la coagulation (la qualité d'enzymes coagulantes, le pH, la température et la vitesse d'acidification) et les caractéristiques originelle du lait.

La première étape de la transformation joue un rôle déterminant sur les caractères du produit fini. Le fromage doit donc s'efforcer de la maîtriser au mieux ; pour cela, il est indispensable d'approfondir les mécanismes biochimiques et physicochimiques responsable de la coagulation du lait (Eck et Gillis, 1997).

### III -3. *Listeria monocytogenes* et denrée alimentaire :

« Aliment » ou « denrée alimentaire » ou « denrée » : substance brute, traitée ou partiellement traitée, destinée à l'alimentation humaine ou animale y compris, les boissons, la gomme à mâcher ainsi que toute substance utilisée dans la fabrication, la préparation et le traitement des aliments, à l'exception des substances employées uniquement sous forme de médicament ou de cosmétique (JORADP, 1990).

Après avoir décrit les caractéristiques de *Listeria monocytogenes* et leur relation avec l'environnement en général, il est plus facile de comprendre pourquoi nous retrouverons les *listeria* à tous les stades de la production des aliments quelque soit leur origine, végétale ou animale, et quelque soit les stades de leur production.

Les produits laitiers notamment le lait cru et ses dérivés, ont été les premières denrées alimentaires à être mise en cause dans l'apparition de cas de listériose chez l'homme, notamment lors des épidémies déclarées en Suisse et aux Etats- unis (Bille, 1989), pour les

quelles les investigations épidémiologiques avaient mis en cause des fromages ; néanmoins de nombreux travaux s'accordent actuellement à dire que c'est les produits prêts à consommer en l'état (RTE, Ready-to-eat) qui sont les produits les plus incriminés et des enquêtes ont montré qu'environ 10% des aliments sont contaminés au moment de leurs distribution (Uyttendaele et al, 1999). La *Listeria monocytogenes* se retrouve également dans d'autres catégories d'aliments telles que les viandes et les produits carnés, les légumes et les produits de mer.

Ainsi *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* sont les espèces les plus fréquemment retrouvées, alors que *Listeria ivanovii* et surtout *Listeria grayi* sont particulièrement rares (Moll et Moll, 2006).

### III-3-1. *Listeria monocytogenes* et laits crus :

Le lait cru est un aliment très fréquemment consommé dans de nombreux pays et en grande quantité. En tant que produit agricole à l'état brut, il est souvent contaminé par *Listeria*, la fréquence de contamination par *Listeria monocytogenes* varie de 0 à 45% depuis la collecte du lait jusqu'aux consommateurs (Larpen, 2004).

Le lait cru peut être contaminé soit par un animal malade excréteur, soit au moment de la traite par contamination fécale ou contamination du lait par les aliments du bétail. Dans ces 2 derniers cas, le rôle des ensilages de mauvaise qualité est à mettre en relief AFSSA (2006) (voire figure 6)

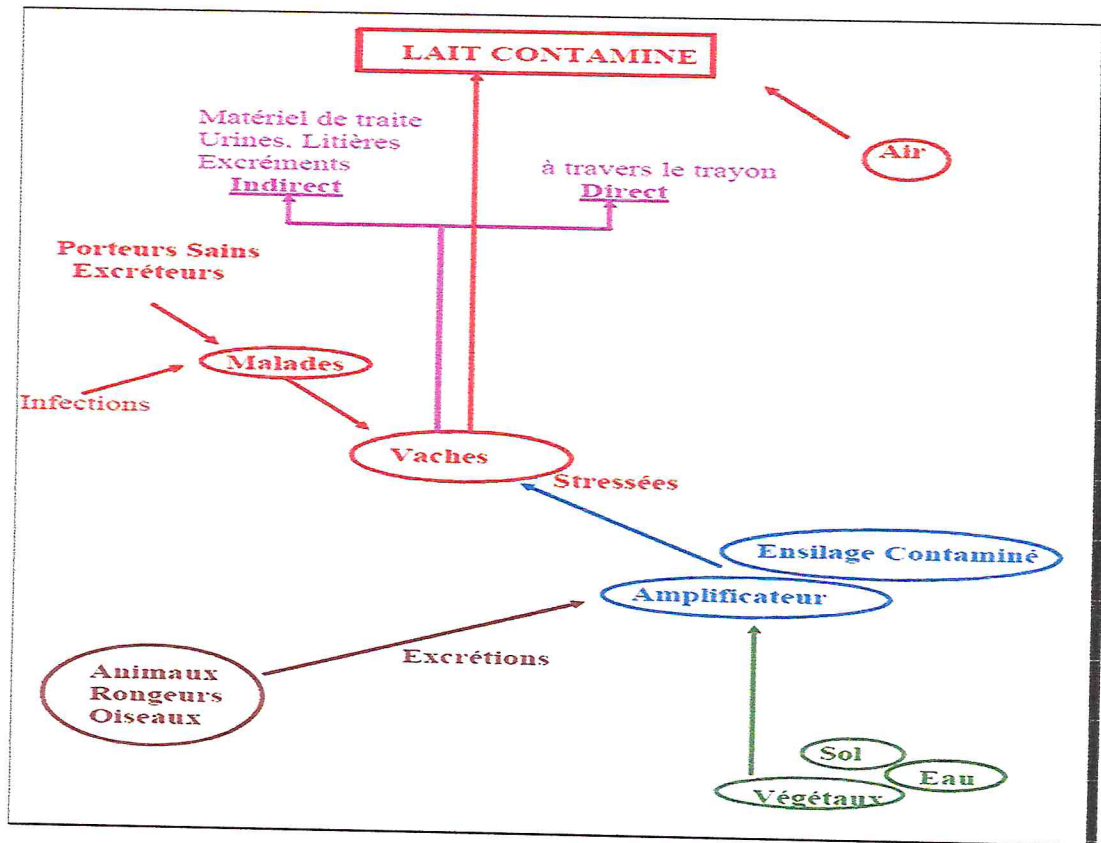


Figure 6: Cycle de contamination du lait cru par *Listeria* (Lebras, 2006)

### III-3-2. *Listeria monocytogenes* et fromages :

Le genre *Listeria* est détecté dans de nombreux types de fromages à des taux et des fréquences variables, les pourcentages d'échantillons positifs pour *Listeria monocytogenes* peut aller jusqu'à 87% (Moll et Moll, 2006).

Des accidents ont pu être observés dans des fabrications utilisant des laits crus ou des laits « thermisés » ou insuffisamment chauffés ou des fabrications utilisant des lait convenablement pasteurisés, mais contaminés en cours de fabrication (saumurage, contamination par le matériel...).

#### ➤ Fromage à pâte molle :

Dans différent pays, plusieurs types de fromage à pâte molle (brie de meaux, camembert) ont été à l'origine de cas sporadique et épidémique de Listériose humaine ,c'est le cas en suisse et en France (1995), il y eut 14 cas de listériose dus à la consommation de fromage à pâte molle (Livarot et Pont L'Evêque). En 1997, 35 cas de Listériose dus à la consommation

de brie (Bille, 1989), la source majeure de contamination est le lait cru, mais des contaminations secondaires sont possibles lors de croisement de produit, par le personnel porteur sain, ou plus fréquemment l'environnement de travail (Jouve, 1996). Ce lait cru contaminé utilisé en fabrication fromagère, particulièrement en pâte molle croûte fleurie ou croûte lavée permet aux *Listeria* de se multiplier au cours de l'affinage (en particulier près de la croûte) et explique les épidémies décrites.

Enfin, La contamination peut survenir également lors de la distribution, pouvant même permettre des transferts de contaminants sur d'autres produits (Ryser, 1999)

### III-2-3. *Listeria monocytogenes* et autres produits laitiers :

*Listeria* est isolée dans de nombreux produits laitiers autres que les fromages tels que les crèmes, crèmes glacées et beurre avec des fréquences variables.

*Listeria* peut également contaminer les yaourts, à 4°C, la survie de la bactérie dépend du pH initial : pour un pH égal à 3.5 et en présence de bactériocine produites par *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes* n'est plus détectée après deux jours de conservation, si le pH initial atteint la valeur de 3,93 (Moll M et Moll N, 2006).

Les crèmes glacées partagent avec le lait de nombreuses caractéristiques, mais s'agissant d'un aliment congelé, *Listeria monocytogenes* ne peut se développer durant le stockage (FAO, 2004).

*Listeria monocytogenes* peut se développer dans les produits laitiers conservés à une température égale ou supérieure à 4°C, elle n'est pas détruite par le séchage du procédé « spray » et survit jusqu'à 16 semaines dans les poudres obtenues (Amgar, 1991).

### III-4. Réglementation :

*Listeria monocytogenes* est recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle. Elle peut être à l'origine d'une intoxication alimentaire grave. Plusieurs pays ont choisi un système de « tolérance nulle » pour la présence de *Listeria monocytogenes* dans les denrées alimentaires se fondant sur la gravité de la listériose et sur le fait que l'on ne connaît pas la dose minimale infectieuse. Cette approche signifie que le microorganisme doit être totalement absent des aliments « prêts à être consommé » (Joradp, 1998).

**-Aux USA :**

La FDA (Food and Drugs Administration) et le département Américain de l'agriculture ont adopté un critères « zéro de tolérance » de la bactérie dans les aliments vendus prêt à la consommation (Labres, 2006) .

**-En France :**

Le conseil supérieure de l'hygiène publique de France et l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) ont d'abord exigé l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 ml ou dans le cas de lait crus et des fromages au lait cru. Plus tard, ils ont décidé pour une tolérance en fin de DLC (Date Limite de Consommation) d'un seuil qui est inférieur ou égal à 100 *Listeria monocytogenes* par g de produit, tout en sensibilisant les consommateurs et notamment les personnes à risque (Federighi, 2005., Jorf, 2006).

**-En Algérie :**

Compte tenu de la situation épidémiologique mondiale, il a été proposé et retenu par l'arrêter suivant (24 janvier 1998) , l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 ml de lait cru Cette norme a même été étendue à un grand nombre de produits alimentaires prêts à être consommés (produits laitiers frais , produits carnés ) ainsi qu'aux produits de la pêche fumés (Joradp,1998).



**Partie II : Partie  
expérimentale**

**Objectif :**

Les objectifs escomptés à travers ce travail sont : la recherche, l'isolement et l'identification des souches *Listeria monocytogenes* dans un fromage à pâte molle «de type Camembert », toute au long du procès de sa fabrication à partir du lait cru jusqu'au produit fini.

Nous allons nous intéresser aussi au dénombrement des souches isolées pour voir l'évolution de la contamination, en s'appuyant sur une méthode de référence normalisée et validée par ISO.

L'échantillonnage, a été réalisé au niveau de la « laiterie fromagerie » de Lactalis de Beni Tamou.

**I.Matériel :****I-1.Matériel de laboratoire :**

Les prélèvements ont été analysés au niveau du laboratoire d'HIDAOA (Hygiène des Denrées Alimentaire d'Origine Animale) de l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire) qui est équipé de matériels d'un laboratoire de microbiologie alimentaire. Les milieux de culture, les réactifs, les suppléments utilisés et leurs formules sont rapportés en annexes I.

**I-2.Matériel biologique :**

Le matériel biologique est représenté par des échantillons prélevés aseptiquement sur 03 productions du fromage de type camembert tout au long de la chaine de sa fabrication sur une période allant du 20 Février jusqu'au 05 mai 2015 (voir la figure 7)



**Figure 7 : Matériel biologique (originale)**



### Processus de fabrication du camembert étudié :

Les premières étapes de la fabrication du camembert consistent à la préparation du lait. Il est alors collecté, analysé puis trié avant d'être concrètement utilisé. C'est le moyen de garantir la qualité du produit fini et de permettre aux services de contrôle d'assurer le respect des bonnes pratiques de fabrication.

Les étapes qui suivent sont l'écémage et la maturation du lait cru, en suite on procède à l'emprésurage (procédé visant à obtenir du lait caillé), puis au moulage. Après la coagulation le fromage subit l'égouttage, incluant le rabattage, le retournement et le plaquage, ce qui est suivi du démoulage et du salage. Chaque étape est minutieusement réalisée dans le but d'offrir un camembert de qualité. Tandis que la dose du salage, en plus de rehausser la saveur du fromage, doit suffire à achever l'égouttage et aider à l'affinage. L'affinage est réalisé dans des hâloirs. C'est durant cette étape que pousse la fine moisissure qui deviendra la croûte du camembert. Le quinzième jour, nous terminons par la mise en boîte du produit. Les étapes de fabrication de camembert est représenté dans la figure n°8.

#### I-2-1. Techniques de prélèvement et condition de transport.

Nous avons prélevé 70 échantillons au niveau de la laiterie de Lactalis.

Les prélèvements sont réalisés dans les meilleures conditions d'asepsie. Les échantillons liquides (lait de vache aux différentes étapes du procès) ont été prélevés dans des flacons de 250ml, les échantillons solides sont placés dans des sacs de prélèvement stériles, ces échantillons sont acheminés vers le laboratoire d'analyse dans une glacière isotherme.

**Tableau 4 :** Nombre des échantillons sur chaque étape

Echantillonnage	nombre	Echantillonnage	nombre
Lait de vache cru	25	Moulage	04
Lait de mélange avant pasteurisation	03	Début d'affinage	04
Lait de mélange après pasteurisation	03	Fin d'affinage	04
Maturation primaire	03	Produit fini	09
Maturation et secondaire	06	Produit fini ( au point de vente)	05
Caillé	04	Total	70

Les différentes étapes de fabrication du fromage Camembert étudié ainsi que la répartition des échantillons sont représentés dans la figure 8 suivante :

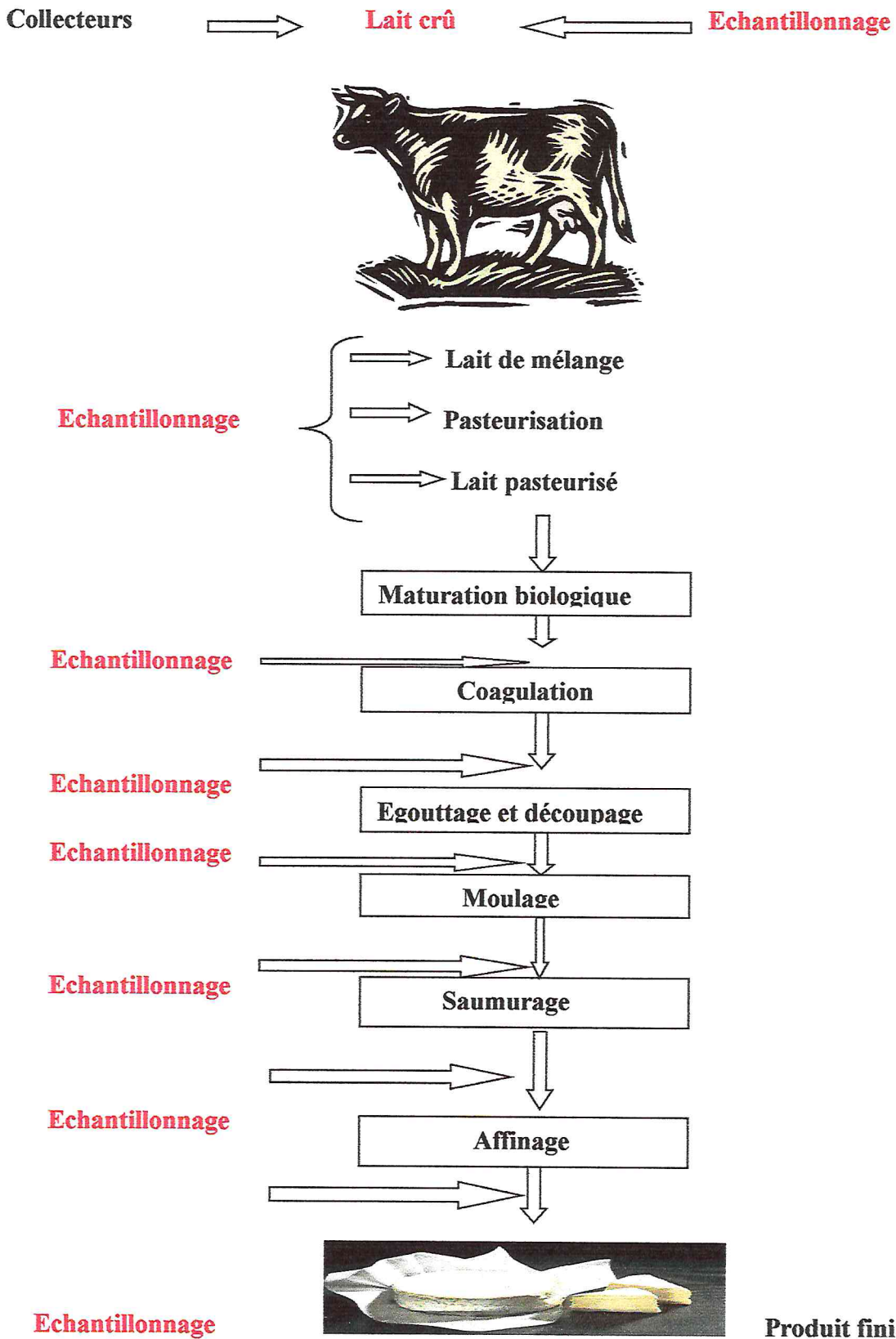


Figure 8 : Plan d'échantillonnages selon ces étapes de fabrication du camembert

## II. Méthodes

### II-1. Préparation des échantillons :

Pour l'échantillon solide, les sacs contenant 25 g d'aliments sont additionnés chacun de 225 ml du bouillon Fraser ½ et sont homogénéisés dans des sacs stomacher. Nous obtenons une dilution mère au un dixième.

Pour les échantillons liquides, introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette graduer, 25 ml de lait dans 225 ml de Fraser ½ (voir la figure 9)

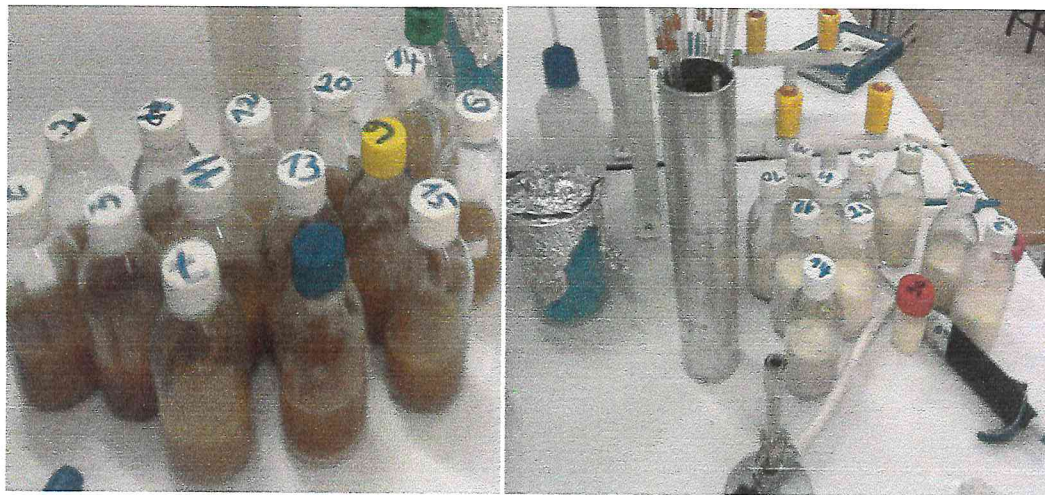


Figure 9 : Préparation des échantillons (originales)

### II-2. Méthodes d'analyse :

#### II-2-1. Méthode d'analyse qualitative :

**Méthode ISO 11290-1. Recherche des *Listeria* à partir des denrées alimentaires. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *listeria monocytogenes*.**

##### II-2-1-1. Objet et domaine d'application.

Cette méthode consiste en la recherche des *Listeria* dans toutes les catégories de laits et produits laitiers.

## II-2-1-2. Recherche et isolement de *Listeria* :

### Principe (mode opératoire) :

Dans le cadre de la présente norme d'ISO 11290-1, la recherche de *listéria monocytogènes* nécessite 04 phases successives selon le protocole suivant :

#### **-préparation de la suspension mère :**

En général, pour préparer la suspension mère, ajouter une prise d'essai de  $x$  g ou  $x$  ml dans  $9x$  ml ou  $9x$  g du milieu d'enrichissement sélectif primaire (bouillon fraser –demi). De façon à obtenir un rapport prise d'essai /milieu d'enrichissement de 1 /10(rapport masse/volume ou volume/volume).

#### ✓ **La première phase : Enrichissement primaire en milieu d'enrichissement sélectif liquide avec concentration réduite en agent sélectifs (bouillon Fraser-demi)**

-Prélever 25 ml de lait cru à analyser dans des flacons sterils contenant 225 de bouillon Fraser au demi additionnée de ses suppléments ou antibiotiques.

- Inoculation d'un milieu d'enrichissement sélectif primaire, contenant un volume de chlorure de lithium et un demi-volume d'acriflavine et d'acide nalidixique (bouillon Fraser-demi), qui est également utilisé comme diluant pour la prise d'essai.

-Incuber à l'étuve la suspension mère à 30° pendant 24 h +/- 2h.

#### ✓ **La deuxième phase : Enrichissement secondaire dans un milieu d'enrichissement sélectif liquide avec concentration complète en agent sélectifs (bouillon Fraser)**

A partir du bouillon d'enrichissement primaire, procéder comme suit :

-Enrichissement secondaire dans des tubes contenant 10 ml de Fraser complet à raison de 0,1 ml, à incuber à 37 C°(ou 35C°) pendant 48 h.

#### ✓ **La troisième phase : Isolement et identification.**

A partir des cultures obtenues, isolement sur les deux milieux sélectifs solides :

a) Gélose OXFORD.

b) Gélose PALCAM.

-Incubation à 30C°, 35C°, ou 37C° et examen après 24 h et, si nécessaire, après 48 h, pour détecter la présence de colonies caractéristiques présumées être des *Listeria spp.*

**Gélose Oxford :** les colonies typiques de *listéria spp*, cultivées sur gélose Oxford pendant 24 h, sont des petites colonies (1 mm) de couleur grisâtres, entourées d'un halo noir. après 48 h, les colonies deviennent plus foncées avec éventuellement des reflets verdâtres, présentent un diamètre d'environ 2 mm, sont entourées d'un halo noir et présentent une dépression centrale.

**Gélose PALCAM :** dans le cas d'une incubation en atmosphère micro aérobie , après incubation, laisser les boites de gélose de PALCAM retrouver leur couleur pourpre en exposant le milieu à l'air libre pendant 1 h. Après 24 h , les *listeria spp* se présentent sous forme de petites ou très petites colonies vertes avec des reflets grisâtres, ou vert olive, de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec parfois centre noir mais toujours entourées d'un halo noir. Après 48 h, les *listeria spp* se présentent sous formes de colonies vertes de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec une dépression centrale, et entourées d'un halo noir.

#### ✓ La quatrième phase : Confirmation

-Dans les cas de fortes suspicions, procéder à une purification sur gélose nutritive (GN)

-Repiquage des colonies présumées être des *L.monocytogenes*.

#### Gélose nutritive :

Les colonies typiques, de 1 mm à 2 mm de diamètre, sont convexes, incolores, translucides, à bord réguliers. Si les colonies ne sont pas bien isolées, repiquer une colonie typique de *listéria spp* sur une nouvelle boite de GN.

Les colonies caractéristiques ayant poussées sur gélose Palcam, Oxford ou Gélose Nutritive (GN) feront l'objet d'une identification biochimique basée sur :

#### Identification du genre *Listeria*, elle-même basée sur :

-Coloration de Gram (petits BGP),

-Test catalase (positif),

#### Identification des espèces du genre *Listeria*, basée elle-même sur :

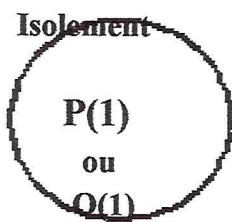
Mobilité (sur gélose mobilité à 22-25°C), Hémolyse de type  $\beta$ , ou Camp-test sur gélose TSA au sang, -Aéro-anaéro facultatif, VP(+) et RM(+), oxydase(-), Nitrate réductase (-), Glucose (+),Gaz(-) et H<sub>2</sub>S(-), Esculine (+), Urée(-), indole (-) et TDA (-), ou mieux encore une galerie biochimique miniature de type API-Listeria.

Jour 1



Enrichissement primaire  
30°C, 18 à 24 h

Jour : 2



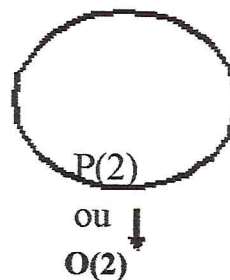
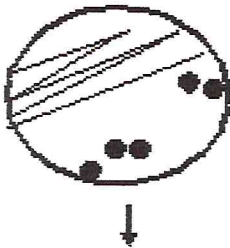
0,1 ml



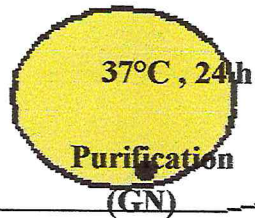
Enrichissement  
Secondaire

37°C, 24 h

Jour : 3



Jour : 4



## II-2-2. Confirmation du genre *listéria* :

### ✚ Etude morphologique et sélection des colonies pour la confirmation :

L'examen morphologique consiste en l'observation des plaques de Gélose Palcam et Gélose Oxford pour reconnaître les colonies caractéristiques.

Prélever à partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs, cinq colonies présumées être des listérias *spp*.

Si une boîte présente moins de cinq colonies présumées, retenir toutes les colonies présumées.

-Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes de gélose tryptone de soja-extrait de levure (TSAYE), préalablement séchées, de façon à permettre le développement de colonies bien isolées.

-Placer les boîtes l'étuve réglée à 35 °C ou 37°C pendant 18 à 24 h ou jusqu'à un développement satisfaisant.

❖ **Les colonies typiques**, de 1 mm à 2 mm de diamètre, sont **convexe, incolore, translucide**, à bord réguliers.

❖ Si les colonies ne sont pas bien isolées, repiquer une colonie typique de *listéria spp* sur une nouvelle boîte TSYEA. Effectuer les essais suivants à partir de colonies d'une culture pure sur TSYEA.

### ✚ Réaction Catalase :

La catalase est une enzyme qui empêche l'accumulation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, catalysant la réaction suivante :



### Mode opératoire :

Placer séparément deux gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 20 volumes sur une lame de microscope.

Prélever une colonie avec une tige de verre (pipette Pasteur) ou en plastique (surtout pas de fil métallique) et l'émulsionner doucement dans une des deux gouttes.

Observer immédiatement et après 5 minutes s'il ya apparition (catalase positive) de bulles d'oxygène. Dans le cas ou il ya doute, recouvrir chacune des gouttes avec lamelles. Les observations peuvent se faire macroscopiquement ou a l'aide d'un microscope à faible grossissement.

**Les listeria sont catalase positives.**



**Figure 10 : Aspect de réaction de catalase (originale)**

#### **✚ Coloration de Gram :**

La coloration de Gram permet la différenciation entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif.

Déposer sur une lame propre une goutte d'eau physiologique, puis prélever une fraction d'une colonie à identifier.

Dilacérer soigneusement et on incorpore progressivement de façon à obtenir une suspension homogène , réaliser le frottis en partant du centre de la lame en décrivant un mouvement circulaire , de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur les  $\frac{3}{4}$  de la lame , puis fixer la préparation à la flamme bleue du BEC BUNSEN.

Recouvrir la lame avec du violet de gentiane et laisser agir durant une minute, jeter l'excès et effectuer deux bais de lugol de 45 secondes.

Décolorer à l'alcool, et laisser agir pendant 30 secondes, puis, rincer immédiatement à l'eau courant.

Recolorer le frottis avec de la fushine pendant une minute, et la rincer de nouveau à l'eau courante.

Sécher la lame au buvard (papier joseph), observer au microscope photonique à l'objectif G X 100. C'est des petits bacilles à Gram positif, en forme de « V » ou de « L ».



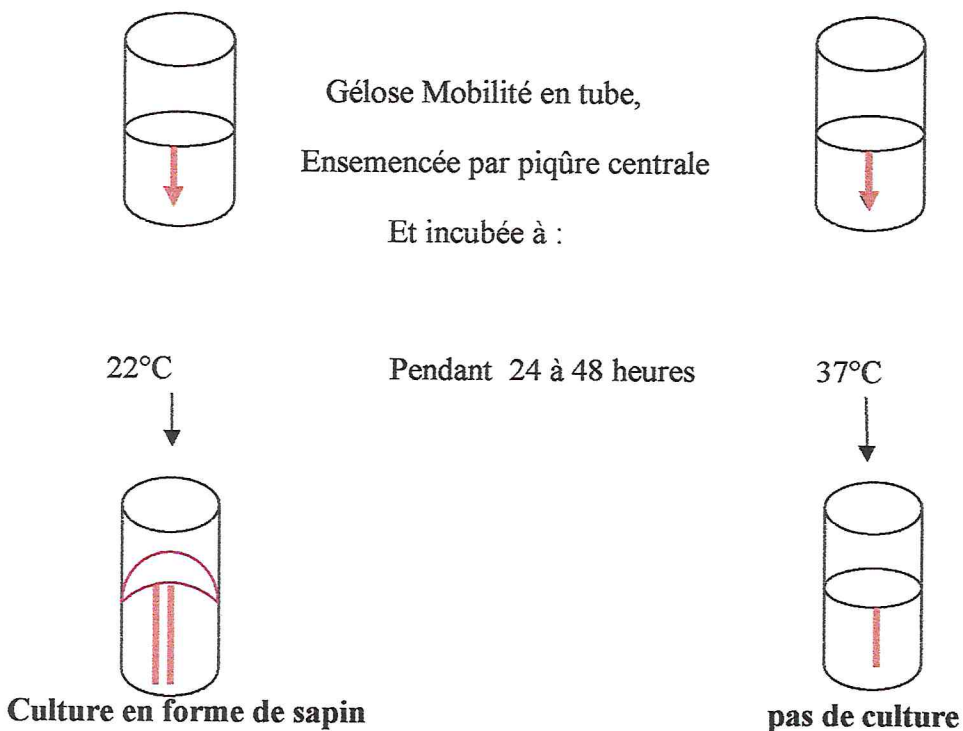
### II-2-3. Confirmation de l'espèce du genre *Listeria* :

#### ➤ Galerie classique :

##### a. La mobilité :

La mobilité est étudiée par l'ensemencement par piqûre centrale sur mannitol mobilité à partir d'une colonie typique de *Listeria*, à incuber à 25°C pendant 24 à 48 heures.

Les *Listeria* sont mobiles à 25°C et présentent un aspect de croissance typique en parapluie sous la surface de la gélose (Figure 11).



**Figure 11 :** Aspect de *Listeria* sur gélose mobilité

Cette mobilité à 22 -25 °C permet également de différencier *Listeria* des bactéries immobiles comme *Erysipelothrix* et la plupart des *Corynébactéries*.

##### b. Recherche de l'hémolyse :

Réaliser un isolement sur gélose au sang de mouton puis incuber à 37°C pendant 24 heures, cette réaction nous permettra de voir si la souche testée est hémolytique ou non. Le test positif se traduit par la présence de zones claires autour de colonies, nous parlons alors d'hémolyse de type  $\beta$ .

**c. Galerie classique :**

Les tests effectués pour cette galerie sont les suivants :

-TSI, VP et RM, oxydase, hydrolyse de l'esculine, urée-indole,

Pour effectuer ces tests, il faut préparer une suspension bactérienne.

Prélever les colonies suspectes à partir de la gélose au sang de mouton.

**▪ Ensemencement sur milieu TSI :**

Ce milieu permet la détection de cinq caractères :

-fermentation des sucres : glucose, saccharose, lactose.

-production de gaz.

-formation de H<sub>2</sub>S ;

Ce milieu est réparti en tube à essai sous forme semi incliné en culot et en pente.

Ensemencer par piqûre profonde le culot au fil droit et en stries la pente puis incuber à 37°C pendant 24 heures.

***Lecture :***

-Dans le culot, l'anaérobiose relative favorise l'utilisation du glucose qui entraîne une acidification et le virage au jaune de l'indicateur de pH : Culot jaune : Glucose (+).

Culot rouge : Glucose (-).

-Sur la pente, l'aérobiose favorise l'utilisation du lactose et /ou saccharose qui entraîne le virage au jaune de l'indicateur coloré : Lactose(+), Saccharose (+).

Si la pente est rouge : Lactose (+), saccharose (-).

-production du gaz : apparition des bulles de gaz dans le culot.

-Formation d' H<sub>2</sub>S : se traduit par un noircissement de la ligne joignant le culot et la pente.

**▪ Vogue Proskauer (VP) et rouge de méthyle (RM)**

La lecture sur le milieu Clarck et Lubs par une colonie caractéristique puis incuber à 37°C pendant 24 heures, le lendemain, verser la moitié du tube dans un autre tube stérile. L'un servira à la recherche de la réaction VP et l'autre pour la recherche de la réaction RM.

Le test de VP permet la révélation de la production d'acétone par fermentation butanediolique après addition des réactifs VP1 et VP2, et en notant la couleur après 3 min de réactifs.

**Lecture :**

- Si la couleur du milieu initial jaune vire au rouge orangé, c'est une réaction positive.
- Si elle reste jaune c'est une réaction négative.

Le test de RM permet la révélation de la fermentation de glucose qui aboutit à la production de nombreux acides par voie des fermentations acides mixtes, après addition du réactif RM.

**Lecture :**

-Si le pH est supérieur à 7 : il y a eu une faible alcalinisation, le test est dit négatif (coloration jaune), donc les bactéries à RM négatif sont celles qui produisent des acides organiques par des voies des acides mixtes.

**▪ Le test de l'oxydase :**

Ce test revient de rechercher la dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui est le cytochrome oxydase.

Au moyen d'une pipette pasteur prélever une fraction de colonie suspecte, puis déposer sur le disque d'oxydase humecté de réactif d'oxalate de N-diméthyle para phénylène diamine qui en présence de l'oxydase donne une semi quinone rouge qui devient violet en présence de l'air.

**Lecture :**

La réaction positive se traduit par l'apparition d'une couleur bleu intense mauve ou violacée dans les 10 secondes qui suivent.

**▪ Hydrolyse de l'esculine :**

L'hydrolyse de l'esculine est testée en ensemençant la gélose esculine par piqûre centrale.

Après 24 h d'incubation à 37°C l'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement de milieu.

**▪ Recherche de tryptophane désaminase, indole et urée :**

Le milieu urée-indol ou urée tryptophane permet la recherche de l'uréase, de la tryptophane désaminase (TDA) et la production de l'indole

Ensemencer le milieu Urée-indol par une culture pure et incuber à 37°C pendant 24 heures.

**Lecture :**

Si le milieu vire au rouge violacé, la réaction est positive est donc la bactérie à hydrolyse l'urée. L'uréolyse se traduit par une alcalinisation du milieu due à la formation du  $\text{NH}_4$ , grâce à la présence d'uréase.

Verser la moitié du tube dans un autre tube stérile. L'un servira à la recherche de l'indole et l'autre pour la recherche de la réaction de tryptophane désaminase.

- ✓ Prendre le premier tube et ajouter quelque gouttes de réactif de Kovacs et s'il y a formation d'un anneau rouge à la surface, réaction est positive.
- ✓ Prendre le deuxième tube et ajouter quelques gouttes de réactif TDA.

S'il y a formation précipité de la couleur marron foncé, la réaction est positive.

(dans le cas où le test est uréase positif, ramener le milieu au pH initial par l'ajout de quelques gouttes de HCl)

#### d. Galerie API *Listeria* (Analytic Prophylactic Index):

API *Listeria* est un système d'identification des *Listeria* utilisant des tests standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données spécifiques.

Il permet la caractérisation du genre *Listeria* par élimination des espèces n'appartenant pas à ce genre.

#### Principe :

La galerie API *Listeria* comporte 10 microtubes ou cupules de substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques ou des fermentations des sucres et qui sont disposés de la façon dont l'indique la figure 12

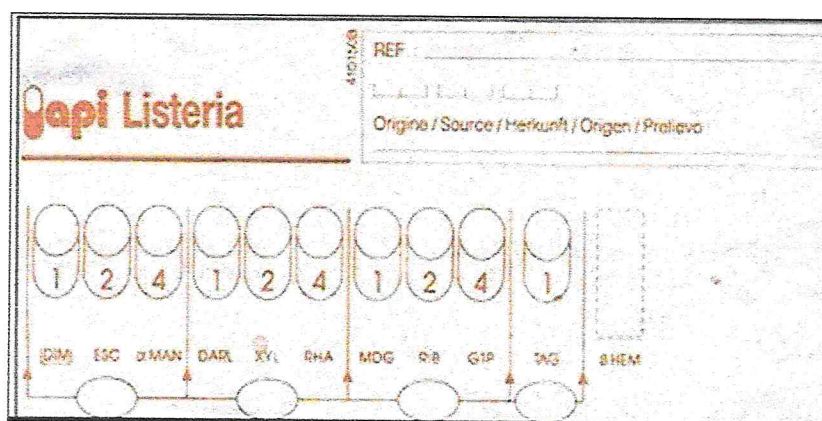


Figure 12 : Fiche de résultats de l'API.

La dénomination des substrats contenus dans les cupules, est la suivante :

**DIM** : Différentiation entre *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*.

**ESC**: Esculine.

**MAN** : Mannosidase.

**DARL** : D-Arabitol.

**XYL** : D-Xylose.

**RHA** : Rhamnose.

**MDG** : Méthyl-D-Glucoside.

**RIB** : Ribose.

**G1P** : Glucose - 1 - Phosphate.

**TAG** : D-Tagatose.

**HEM** : Hémolyse.

Durant la période d'incubation, les réactions produites se traduisent par des virages spontanés ou se révèlent par l'addition des réactifs.

#### **Mode Opératoire :**

Les cultures bactériennes à étudier doivent être considérées comme potentiellement dangereuses et doivent être manipulées de façon appropriée par un personnel compétent et averti.

Avant d'ensemencer une galerie, il faudrait tout d'abord s'assurer de la purification de la souche et de son appartenance au genre *Listeria* (courts bacilles à Gram positif, mobiles à 25°C mais pas à 37°C, catalase positive et oxydase négative) à l'aide d'une subculture réalisée sur gélose au sang à partir d'une colonie bien isolée.

Réunir ensuite fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles du fond pour créer une atmosphère humide. Inscrire la référence de la souche à étudier sur la languette latérale de la boîte.

Sortir la galerie de son emballage d'origine et individuel et la placer dans la boîte d'incubation puis se débarrasser du sachet déshydratant. Ouvrir ensuite une ampoule de suspension Médium, puis prélever à l'aide d'une pipette, quelques colonies isolées pour réaliser une suspension d'une opacité égale à 0,5 Mac Farland.

Observer le type d'hémolyse et le noter sur la fiche de résultats, ce caractère constituant un test additionnel.

Répartir la suspension bactérienne précédente dans les cupules ou micro tubes en évitant d'introduire des bulles d'air, pour cela incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pipette sur le côté de la cupule formant un angle d'environ 45°.

En ce qui concerne le test DIM, remplir environ 100 µl soit 2 gouttes de pipette Pasteur en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.

En ce qui concerne les autres tests, remplir uniquement la partie basse des cupules des tests ESC à TAG, soit environ 50 µl ou 1 goutte de pipette Pasteur.

Refermer la boîte d'incubation et l'incuber à 35 - 37 °C, pendant 18 à 24 Heures en aérobiose.

#### **Lecture de la galerie.**

Tout d'abord, ajouter 1 goutte de réactif ZYM B au test DYM, laisser agir pendant 3 minutes, puis lire ; ce test sert de base essentielle pour la différenciation entre la *Listeria monocytogenes* pour laquelle il est négatif et la *Listeria innocua* pour laquelle il est au contraire positif.

Noter ensuite toutes les réactions positives par le signe (+) et les réactions négatives par le signe (-) sur la fiche de résultats en se référant au tableau relatif à la liste des profils numériques.

Coder par la suite les réactions obtenues en un profil numérique, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur de 1, 2 ou 4.

En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil de 4 chiffres est obtenu, exemple : 6510. L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste des profils qui figure ci après.

**Tableau 5** : Lecture et Interprétation des caractères portés sur la galerie API.

Tests	Réactions	Résultats	
		Négatifs	Positifs
DIM	Différenciation <i>Listeria innocua</i> / <i>Listeria monocytogenes</i>	Orange pâle Rose beige Gris bleu	Orange
ESC	Esculine (hydrolyse)	Jaune pâle	Noir
& MAN	& MANnosidase	Incolore	Jaune
DARL	D-Arabitol (Acidification)	Rouge . Rouge - Orangé	Jaune . Jaune - Orangé
XYL	D-XYlose (Acidification)		
RHA	RHAMnose (Acidification)		
MDG	&Méthyl-D-Glucoside (Acidification)		
RIB	RIBose (Acidification)		
G1P	Glucose - 1 - Phosphate (Acidification)		
TAG	D-TAGatose		

### II-2-2. Analyse quantitative :

Méthode ISO 11290-2 dénombrement de *listéria monocytogenes* à partir des denrées alimentaires.

#### a. Objet et domaine d'application :

Cette méthode consiste en la recherche et le dénombrement de *listéria monocytogènes* dans toutes les catégories de denrées alimentaires.

#### b. Dénombrement de *Listéria monocytogènes* :

Détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) de *listeria monocytogenes* dans une quantité déterminée de produit, lorsque l'analyse est effectuée conformément à la présente norme.

#### c. Principe :

Le dénombrement de *listéria monocytogenes* nécessite six étapes successives :

- Préparation de la suspension mère dans un diluant.
- Revivification pendant une heure à 20 °C.

- Ensemencement en surface du milieu sélectif solide coulé dans deux boîtes de Pétri, à raison de 0,1 ml par boîte.
- Incubation des boîtes à 35°C et un examen après 24 à 48 heures.
- Confirmation des colonies présumées être des *Listeria monocytogenes*.
- Calculer le nombre de *Listeria monocytogenes* à partir du nombre de colonies confirmées par gramme ou par millilitre.
- **Dénombrement des colonies caractéristiques.**

Après incubation pendant 24 heures, et 18 à 24 heures supplémentaires, si le développement est faible ou si aucune colonie n'est observée après 24 heures d'incubation, examiner les boîtes afin de rechercher la présence de colonies présumées être des *Listeria spp.*

Dans le cas d'une incubation en atmosphère micro aérobie, après incubation, laisser la gélose retrouver sa couleur pourpre en laissant les boîtes de gélose PALCAM à l'air libre pendant 1 heure.

Après 24 heures, les colonies caractéristiques de *Listeria spp.*, se présentent sous forme de petites ou très petites colonies vertes avec des reflets grisâtres, ou vert olive, avec parfois un centre noir mais toujours entourés d'un halo noir.

Après 48 heures d'incubation, les *Listeria* se présentent sous forme de colonies vertes de 1,5 à 2 mm de diamètre avec une dépression centrale et entourées d'un halo noir.

Compter alors toutes les colonies présumées être des *Listeriai spp* pour chacune des boîtes contenant au moins 150 colonies caractéristiques et non caractéristiques.

#### ➤ Confirmation du Genre *Listeria spp.*

Sélection des colonies pour la confirmation : pour cela retenir les boîtes contenant au maximum 150 colonies présumées être des *Listeriai spp* à toutes les dilutions et, si possible au niveau de deux dilutions successives.

Sélectionner trois à cinq colonies présumées sur chaque boîte retenue. Si une boîte présente moins de cinq colonies présumées, sélectionner pour la confirmation toutes les colonies présumées.

Ensemencer en stries les colonies sélectionnées sur la surface des boîtes contenant de la gélose TSYEA qui seront incubées à leur tour à l'étuve à 35 ou à 37°C pendant 18 à 24 heures.



➤ **Expression des résultats.**

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de calculer la valeur de **a** pour chacune des boîtes retenues selon la formule suivante : en prenant en considération les boîtes contenant au minimum 15 colonies.

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

**A** : est le nombre de colonies répondant aux critères d'identification.

**b** : le nombre total de colonies repiquées en vue de l'identification.

**C** : le nombre total de colonies dénombrées sur la boîte.

Calculer ensuite la valeur du **N** de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives à l'aide de la formule suivant :

$$N = \frac{\sum a}{V(n_{\square} + 0,1 n_{\blacksquare}) d}$$

Ou :

$\sum a$  : est la somme des *Listeria* identifiées sur chaque boîte retenue et qui compte au moins 15 colonies.

**V** : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitre.

$n_{\square}$  : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution.

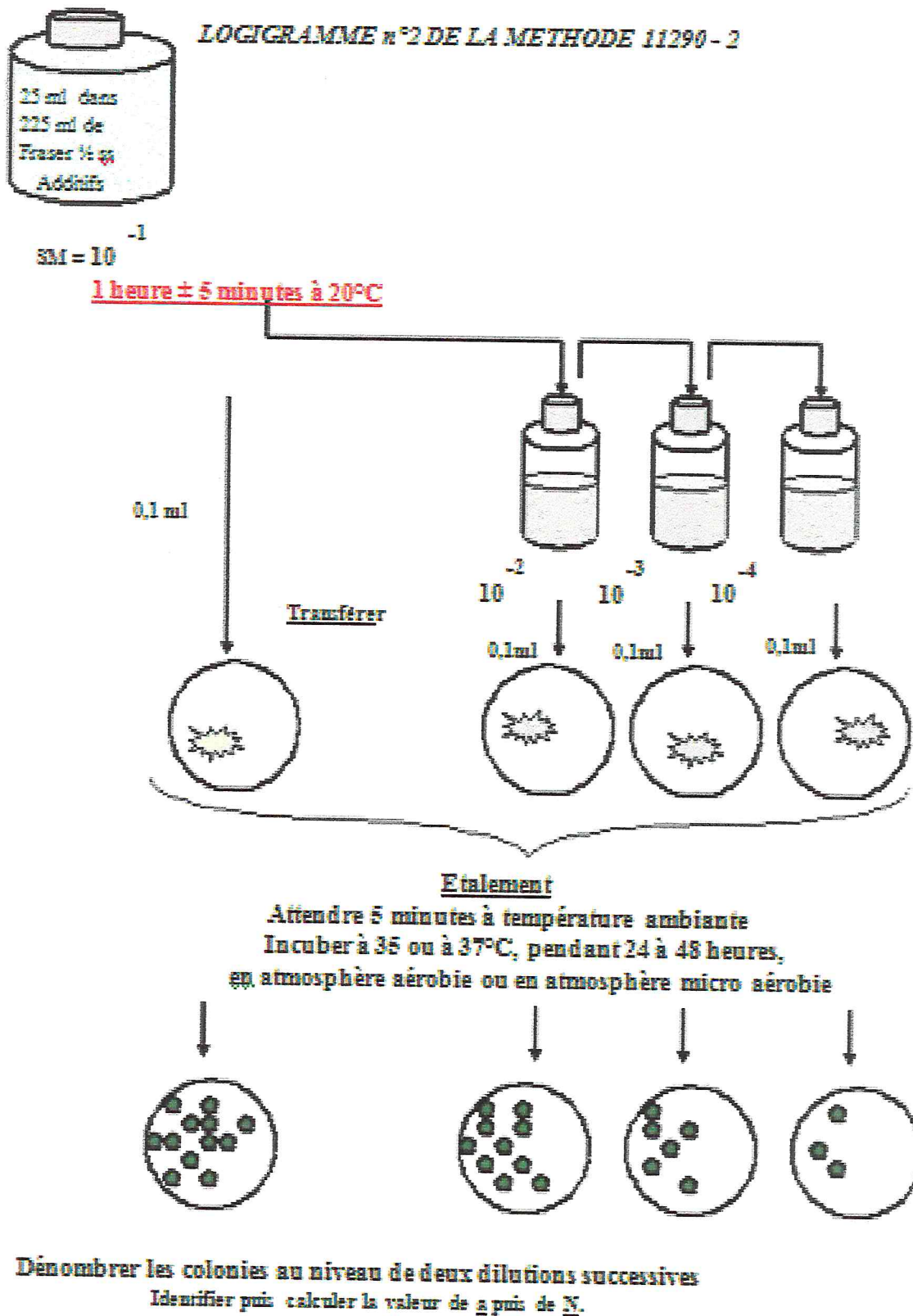
$n_{\blacksquare}$  : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution.

**d** : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédent n'est pas modifié ; si ce dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent est augmenté d'une unité.

Procéder de proche en proche jusqu'à ce que l'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits).



### III. Résultats

#### III-1.Echantillonnage

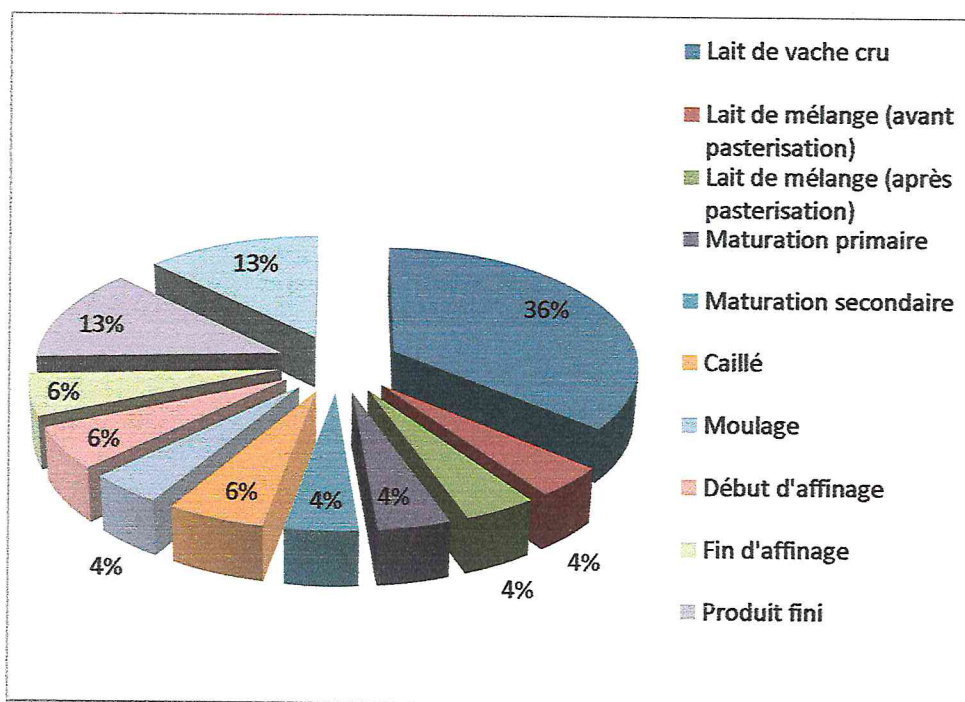
La recherche de *Listeria monocytogenes* est faite sur 70 prélèvements issus des différentes étapes de fabrication du camembert analysé, à partir du lait de vache cru jusqu'au produit fini.

Elle est faite sur trois productions du camembert analysé, la répartition des prélèvements a été réalisée rapportée dans le tableau suivant:

**Tableau n °6 : Répartition des prélèvements sur les 3 productions.**

Production	Numéro de prélèvement
1 <sup>ère</sup> production	(01-25)
2 <sup>ème</sup> production	(26-50)
3 <sup>ème</sup> production	(51-70)

La répartition des échantillons sur différentes étapes de fabrication du camembert est représentée dans la figure suivante :



**Figure 13 :** Echantillonnage sur différentes étapes de fabrication du Camembert.

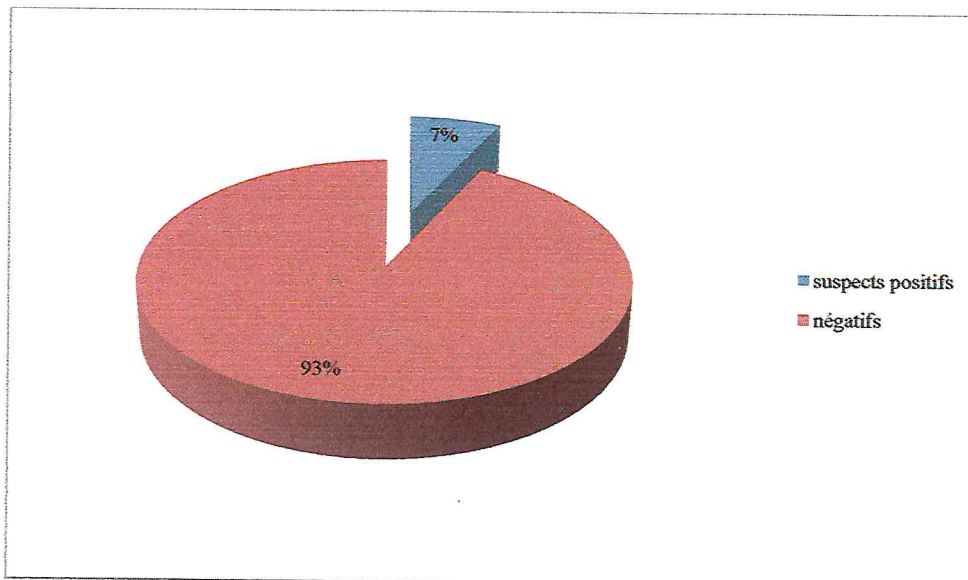
### III-2. Identification du genre

Sur les 70 prélèvements analysés, 05 sont suspectés être positifs pour *Listeria spp*. L'identification est basée d'une part sur l'aspect des colonies (sur les milieux sélectifs Palcam et oxford), et d'autre part sur la réaction de la catalase et la coloration de Gram. Les résultats de l'analyse de l'ensemble des prélèvements sont représentés dans le tableau suivant :

**Tableau 7:** Résultats de la recherche de *Listeria monocytogenes*

	Nombres de prélèvements	Pourcentage %
Prélèvements suspects être positifs	05	7
Prélèvements négatifs	65	93
Total	70	100

Les résultats du tableau 7 sont représentés sous forme d'un secteur pour une meilleure illustration :

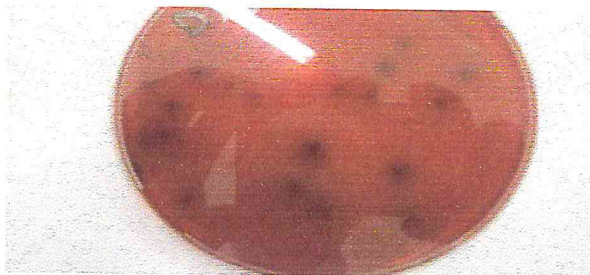


**Figure 14 :** Résultats de la suspicion de *Listeria monocytogenes* dans les prélèvements analysés

Les 05 prélèvements suspectés être positifs ont été prélevés à partir de lait cru.

❖ **Aspect morphologique**

- **Aspect sur gélose PALCAM :**



**Figure15:** Aspect des colonies suspectes de *Listeria spp* sur gélose Palcam (**originale**)

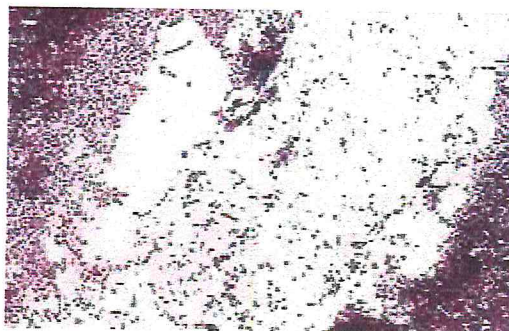
**Aspect sur gélose OXFORD :**



**Figure 16:** Aspect des colonies suspectes de *Listeria spp* sur gélose Oxford (**originale**)

❖ **Aspect au Gram :**

Toutes les souches suspectes isolées à partir des 5 échantillons sont des bacilles Gram positifs, droits aux extrémités arrondies, isolés en paires, formants des angles « V » (voir figure 17).



**Figure 17 :** Aspect microbiologique de *listéria* après coloration de Gram (**Lebres, 2006**).

**❖ Test de la catalase :**

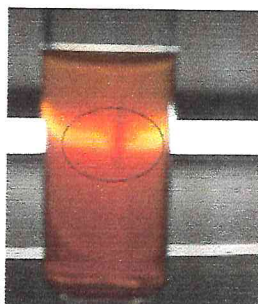
Ce test est révélé positif pour toutes les souches suspecté (voir figure 18).



**Figure 18:** Aspect de la réaction catalase (originale)

**❖ La mobilité :**

Les 05 souches isolées sont mobiles à 20°-25°C, le test révèle l'image d'un sapin renversé (parapluie) caractéristique, tel qu'on peut remarquer sur la figure 19.



**Figure 19:** Aspect de *Listeria* sur gélose mannitol mobilité à 25°C

**III-3. Identification de l'espèce :****❖ Galerie API Listeria :**

Après 24 h d'incubation et l'adjonction du réactif ZYM.B, le profil de la galerie miniaturisée API Listeria des souches isolées n'ont montré aucun profil figurant sur la liste de la galerie **Annexe II**.

**III-4. Résultats de dénombrement :**

Selon la norme ISO 11290-2 le dénombrement est appliqué dans le cas de présence de *Listeria monocytogenes* par millilitre ou par gramme et vu que la recherche a révélé une absence totale de cette espèce, le dénombrement n'a pas été effectué.



#### IV. Discussion

Suite à l'absence totale de *Listeria monocytogenes* que nous avons constaté au cours de notre étude, nous nous sommes posé les hypothèses suivantes :

- Le lait possède des moyens de défenses

-Zones de provenance du lait est indemnes

-La mise en place et le respect des règles du système HACCP sont les causes de l'absence du germe

En effet, selon **Ivanek et al, (2006)**, le lait est un produit d'excrétion très fragile qui peut facilement être contaminé par différentes espèces bactériennes, notamment par *L.monocytogenes* Cependant, à l'état cru, il possède des moyens de défense contre le développement de *Listeria spp.* Ainsi **Portalier, (2002)** a rapporté que la présence d'une microflore lactique naturelle qui rentre en compétition avec la bactérie permet de limiter sa croissance (sauf en présence de *Pseudomonas* qui stimule son développement), de même certaines substances qui se trouvent en faible quantité (immunoglobuline, Lactoperoxydase, lysozyme, lactoferrine) ont un rôle antibactérien.

En outre, **Larpen, (2004)**, **Kacem et al (2004)** et **Richard et al (2004)**, ont montré que certaines bactéries lactiques qui excrètent des substances antibactériennes dites bactériocines inhibent la croissance des *Listeria*. Il se peut donc, que le lait analysé ait une résistance naturelle vis-à-vis des *Listeria monocytogenes* par une teneur importante de la flore lactique en compétition.

**Nicolas et al, (1989)** ont souligné que l'ensilage est le principal facteur de risque pour la dissémination des *Listeria* dans les élevages laitiers. **Lebres, (2004)** a rapporté que le rôle des ensilages dans la contamination des ruminants par *Listeria* a été mis en évidence depuis les années 60 c'est pourquoi, elle a reçu le nom de « maladie de l'ensilage ». Plus de 50% des matières fécales des animaux consommant de l'ensilage contiennent des *Listeria* qui contaminent les litières, le sol des locaux de traite, la peau des trayons et le lait au moment de la traite.

En effet **Portalier, (2000)** a suggéré que les ensilages mal conservés et/ou mal préparés, dont le PH est supérieur à 4, laisse la possibilité à *Listeria* de se développer. Ce défaut d'acidification de l'ensilage peut provenir d'un mauvais tassement et de l'emploi des bâches de mauvaise qualité. **Larpent, (2004)** et **Pujol-Dupuy, (2004)** ont démontré que ce sont les parties superficielles du silo qui présentent le plus de risque.

Selon le services agro-élevage de la laiterie de Beni Tamou l'alimentation distribuée pour les vaches d'où provenait le lait cru , semblait être composée du vert, sorgho, paille, concentrés, l'utilisation de l'ensilage est complètement absente dans ces élevages.

**Baird- Parkera et Mayest (1991)**, ont noté que la mise en place de système HACCP et le respect des points cardinaux de ce dernier semble jouer un rôle majeurs dans l'absence de *Listeria monocytogenes* dans les différentes étapes de fabrication de camembert, ce résultat pourrait expliquer l'absence de listeria dans les prélèvements analysés au cours de notre étude.

Le système d'analyse des dangers –points critique et leurs maitrise est une méthode, une réflexion où bien une démarche systématique et préventive pour assurer la qualité et la sécurité des produits alimentaires.

Au niveau da laiterie de Béni Tamou le système HACCP est bien appliqué, depuis les élevages jusqu'aux produit prêt à consommer.

Au niveau des exploitations le service agro-élevage contrôle l'hygiène des bâtiments en leur disposant des désinfectants.

A la réception du lait le service qualité exige un cahier de charge aux collecteurs (propreté des citernes et caractères physicochimiques et bactériologiques du lait), le lait répondant aux critères exigés est destiné à la fromagerie.

Au niveau des ateliers de production nous avons constaté l'installation adéquate des locaux avec séparation des opérations (principe de marche en avant), pour éviter le risque de contamination croisées. Un plan de désinfection et de nettoyage est assuré (pédiluve, des tenus spécial pour le personnels : port de charlotte, de gants, bottes et vêtements de travail). Une analyse bactériologique est réalisée sur toutes les étapes tout au long du processus de fabrication du produit.

## Conclusion

Les bactéries pathogènes ont toujours constitués un véritable danger pour la santé de l'homme. Elles sont responsables de nombreuses infections et intoxications aux quelles nous sommes tous exposés. Il est donc impératif de maîtriser leur identification et leur dénombrement dans nos aliments.

La *Listeria monocytogenes* aussi bien pathogène pour l'homme que pour l'animal, doit être recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle car elle peut être à l'origine d'intoxications alimentaires graves. Ce risque est d'autant plus élevé que ce germe est psychotrope, peut se développer tout au long de la chaîne de conservation des produits laitiers.

Les produits transformés prêts à consommer parmi lesquels se retrouvent le lait cru et produits dérivés, notamment les fromages à pâte molle sont particulièrement concernés.

L'étude réalisée sur 70 prélèvements, a révélée une absence totale de *Listeria monocytogenes* tout au long du procès de fabrication du camembert analysé.

Les résultats obtenus montrent alors une bonne conformité aux normes imposées par la réglementation pour le lait cru et les fromages qui stipulent l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25ml de lait cru, et sur un grand nombre de produits alimentaires prêts à être consommés. Ce résultat est une conséquence directe des bonnes pratiques de fabrication et de l'application rigoureuse des principes HACCP par la laiterie de Beni tamou.

En conclusion, il nous semble plus qu'important la généralisation de l'application du système HACCP à fin lutter contre la contamination des matières premières d'origine animale et de leurs produits dérivés par *Listeria monocytogenes*.

## ***Recommandations***

Les mesures de prévention des listérioses ont pour but de réduire les risques de contaminations des aliments par *L.monocytogenes* lors de la production des matières premières en particulier d'origine animale, dans les industries de transformation et chez le consommateur.

### **❖ Au niveau des productions agricoles** (production de viande ou de lait):

- ✓ Il est indispensable de respecter les règles d'hygiène des locaux, des animaux et du personnel.
- ✓ Il faut veiller à alimenter les animaux avec un ensilage de bonne qualité.
- ✓ Il faut veiller à une hygiène rigoureuse des camions et du matériel utilisé pour la collecte du lait et son transport vers les usines de transformation.

### **❖ Dans les industries de transformation**

Les locaux doivent respecter les 3 grands principes de conception hygiénique :

- ✓ Marche en avant.
- ✓ Séparation des secteurs et non entrecroisement des circuits.
- ✓ Contrôler le déplacement des personnes qui sont des vecteurs potentiels de *L.monocytogenes*.

Il est indispensable de définir un plan de nettoyage et de désinfection des locaux et de matériel. Un contrôle régulier de l'efficacité de nettoyage et désinfection doit être effectué en particulier dans les zones à risque (chambre froide, locaux de stockage .....).

Les traitements thermiques doivent être adaptés et les étapes où un risque de contamination après traitement thermiques existe doivent être identifiées et maîtrisées.

Les unités de transformation doivent, si possible, être équipées de station de traitement des effluents afin de minimiser les rejets de *L.monocytogenes* dans l'environnement.

### **❖ Chez le consommateur :**

Pour les personnes, il est recommandé :

- ✓ D'éviter la consommation de lait cru et de produits à base de lait cru.
- ✓ De cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale.
- ✓ De conserver les aliments crus, séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés.
- ✓ De nettoyer fréquemment le réfrigérateur et le désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée.
- ✓ De respecter les dates limites de consommation.
- ✓ D'éviter les croutes des fromages.
- ✓ De se laver les mains, nettoyer les ustensiles de cuisine avec de l'eau de javellisée.

❖ **Au niveau de la réglementation**

- ✓ La mise en place d'un réseau d'épidémiologie efficace, ainsi que la déclaration obligatoire des cas de la listériose humaine, permettant une détection rapide du moindre accident listérien et de juguler au plus vite une éventuelle épidémie.
- ✓ Il serait judicieux, pour mieux lutter contre la contamination listérienne des matières premières d'origine animale comme le lait, la viande et les œufs, de classer la listériose animale dans la liste des maladies à déclaration obligatoire

**Précautions à prendre pour la prévention de la listériose chez la femme enceinte, les patients immunodéprimés et les personnes âgées.**

**Aliment à éviter :**

- ✓ Eviter la consommation de fromages à pâte molle au lait cru et des fromages vendus râpés.
- ✓ Eviter la consommation des poissons fumés et des coquillages crus.

## ANNEXE I

### Matériel de travail

#### Equipement de laboratoire :

C'est l'équipement classique d'un laboratoire de microbiologie alimentaire :

- Tube à essai stérile.
- Flacon stériles.
- Pipettes pasteur.
- Pipettes graduées stériles de (1-2-5-10-20ml).
- Boites de Pétri stériles.
- Etuve de 30°C et 37°C.
- Stomacher.
- Microscope photonique.
- Bec benzène.
- Balance.
- Glaciaire.
- Portoirs, pinces et des lames microscopiques.

#### Milieux de culture :

- Bouillon FRAZER.
- Gélose PALCAM.
- Gélose OXFORD.
- Gélose au sang.
- Milieu de CLARK et LUBS.
- Milieu Urée –Indole.
- Gélose mannitol-Mobilité.
- Galerie API.

#### Réactifs :

- Les suppléments et additifs pour les milieux : PALCAM et FRAZER.
- Les réactifs : VPI, VPII, KOVACS et TDA.
- Les colorants (violet de gentiane, Lugol, Fuchsine), Alcool.
- Eau oxygénée.

- Huile à immersion.

### **Les milieux de culture hydratés et déshydratés :**

Les formules sont indiquées en gramme par litre d'eau distillée.

#### **1. Bouillon de Frazer :**

Milieu pour l'enrichissement sélectif pour *listéria*.

#### **Composition du milieu :**

➤ Peptone de viande (digestat pepsique de tissu animal).....	5
➤ Tryptone (digestat pepsique de casiéne).....	5
➤ Extrait de viande.....	5
➤ Extrait de levure.....	5
➤ Chlorure de sodium.....	20
➤ Hydrogénophosphate disodique dihydraté.....	12
➤ Dihydrogénophosphate de potassium.....	1,35
➤ Esculine .....	1
➤ Chlorure de lithium.....	3
➤ Sel de sodium d'acide nalixidique.....	0,2
➤ Eau .....	1 000 ml

#### **2. Gélose PALCAM :**

La gélose PALCAM est un milieu sélectif utilisé pour la différenciation et l'isolement de *Listéria* dans les prélèvements pathologiques, le lait et les fromages ainsi que dans les autres prélèvements même fortement contaminés.

#### **Composition :**

➤ Peptone de viande .....	23
➤ Extrait de levure.....	3
➤ Glucose .....	0,5
➤ Amidon .....	1
➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Esculine.....	0.8
➤ Citrate ferrique ammoniacal.....	0.5

➤ Chlorure de lithium.....	15
➤ Mannitol.....	10
➤ Rouge de phénol.....	0.08
➤ Agar (Columbia) .....	18

### **3. Gélose OXFORD :**

La gélose OXFORD est un milieu sélectif utilisé pour la différenciation, l'isolement et le dénombrement de *listéria monocytogenes* dans le lait et les fromages, ainsi que dans les autres produits alimentaire, même fortement contaminés.

#### **Composition :**

➤ Polypeptone.....	20,0
➤ Extrait autolytique de levure.....	3,0
➤ Amidon .....	1,0
➤ Chlorure de sodium.....	5,0
➤ Esculine .....	1,0
➤ Citrate ferrique ammoniacal.....	0,5
➤ Chlorure de lithium.....	15,0
➤ Cycloheximide.....	400,0
➤ Colistine (sulfate).....	20,0
➤ Fosfomycine.....	10,0
➤ Acriflavine.....	5,0

### **4. Gélose au sang :**

Ce milieu nutritif de base sert à la préparation d'Agar au sang par addition de 5 à 8% de sang de mouton, de cheval, de lapin ou humain en vue de l'isolement et de culture de divers micro-organismes pathogènes exigeants ainsi que pour l'identification de formes hémolytiques. Le milieu peut être utilisé sans sang, par exemple pour des hémocultures et comme base de milieux spéciaux.

#### **Compostion :**

➤ Peptone de viande.....	10
➤ Peptone de caséine.....	5
➤ Extrait de levure.....	3



➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Agar.....	18

### **5. Mannitol mobilité :**

Ce milieu permet de rechercher simultanément la mobilité et l'utilisation du mannitol.

#### **Composition :**

➤ Peptone de viande .....	15
➤ Extrait de viande.....	3
➤ Mannitol.....	10
➤ Potassium nitrate.....	1
➤ Rouge de phénol.....	0,05
➤ Agar.....	5

### **6. Milieu de CLARCK et Lubs :**

Bouillon glucosé permet la révélation de fermentation du glucose (réaction de vogge-prosker et rouge de méthyle).

#### **Composition :**

➤ Tryptone.....	2
➤ Peptone bactériologique.....	5
➤ Phosphate potassique.....	5
➤ Glucose .....	5

### **7.Gélose TSI(Triple Sugar Iron) :**

Cette gélose permet de mettre en évidence la fermentation du glucose ou du lactose, (avec ou sans dégagement gazeux), du saccharose et de la production d'hydrogène sulfuré.

#### **Composition :**

➤ Peptone de viande .....	15
➤ Proteose peptone.....	5
➤ Extrait de viande.....	3
➤ Extrait de levure.....	3

➤ Glucose.....	1
➤ Saccharose.....	10
➤ Lactose.....	10
➤ Citrate de fer ammoniacal.....	0,3
➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Sodium thiosulfate.....	0,3
➤ Rouge de phénol.....	0,5
➤ Agar.....	18

### **8.Urée Indole :**

Permet de rechercher l'uréase et la production d'indole.

#### **Composition :**

➤ L-tryptophane.....	3
➤ Phosphate dipotassique.....	1
➤ Phosphate monopotassique.....	1
➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Urée.....	20
➤ Rouge de phénol.....	2,5

### **9.Agar à L'esculine**

#### **Composition :**

➤ Peptone de viande .....	10
➤ Citrate de fer ammoniacal.....	1
➤ Esculine.....	1
➤ Bile de bœuf .....	3
➤ Agar.....	18

## Les suppléments :

### **Suppléments pour bouillon FRAZER :**

#### Composition :

- Acriflavine.....28,1 mg
- Acide nalidixique.....22,5 mg
- Citrate de fer III ammoniacal.....112,5mg

#### Préparation :

Ajouter stérilement :

- 2,25 ml du flacon à 225 ml du bouillon FRAZER.
- 0,1 ml du flacon de bouillon FRAZER.

### **Supplément pour gélose PALCAM :**

#### Composition :

- Sulfate de polymyxine B.....500UI.
- Ceftazidine.....10 mg.
- Acriflavine.....2,5 mg.

#### Préparation :

Ajouter stérilement 2,25ml du flacon à 225ml de gélose de base PALCAM fondue, bien mélanger et répartir en boites de petrie.

**NB :** il est indispensable d'éviter toute super exposition du supplément à la lumière.

### **Supplément pour gélose OXFORD :**

#### Composition :

- Cycloheximide.....200, 0 mg
- Colistine (sulfate).....10,0 mg
- Céfotétan.....1,0 mg
- Fosfomycine.....5, 0 mg
- Acriflavine.....0,5 mg

**Galerie API :**

**Composition :**

La composition de la galerie est le suivant :

**Milieu :** API suspension medium

- Eau déminéralisée.....2 ml

**Réactif :**ZYM B (8ml)

- 2-Méthyléthanol.....100 ml.
- Fast Blue (matière active).....0,12 g

**Condition de stockage :**

**Galerie :** la galerie se conserve à 2-8 °C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

**Milieu :** le milieu se conserve à 2-30°C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage.

**Réactif :** le réactif ZYM B est très sensible à la lumière : il doit être conservé à l'obscurité à 2-8 °C jusqu'à la date limite d'utilisation indiquée sur l'emballage. Après ouverture de l'ampoule, entourer le flacon d'une feuille d'aluminium, le remettre rapidement au réfrigérateur après utilisation.

## Annexe II

### LISTE DES PROFILS NUMERIQUES DES LISTERIA SUR GALERIE API

2150	Listeria ivanovii	3750	Listeria ivanovii
2170	Listeria ivanovii	3770	Listeria ivanovii
2250	Listeria ivanovii	6010	Listeria monocytogenes
2310	Listeria seeligeri / ivanovii	6110	Listeria monocytogenes / innocua
2311	Listeria welshimeri	6120	Listeria grayi
2330	Listeria ivanovii	6130	Listeria grayi
2340	Listeria ivanovii	6150	Listeria monocytogenes
2350	Listeria ivanovii	6310	Listeria seeligeri / welshimeri
2370	Listeria ivanovii	6311	Listeria welshimeri
2410	Listeria monocytogenes	6410	Listeria monocytogenes
2510	Listeria monocytogenes	6450	Listeria monocytogenes
2550	Listeria monocytogenes /ivanovii	6510	Listeria monocytogenes
2711	Listeria welshimeri	6520	Listeria grayi
2750	Listeria ivanovii	6550	Listeria monocytogenes
2770	Listeria ivanovii	6701	Listeria welshimeri
3110	Listeria seeligeri/innocua/ivanovii	6711	Listeria welshimeri
3120	Listeria grayi	7110	Listeria innocua
3130	Listeria grayi / ivanovii	7111	Listeria welshimeri
3150	Listeria ivanovii	7120	Listeria grayi
3170	Listeria ivanovii	7130	Listeria grayi
3210	Listeria seeligeri / ivanovii	7301	Listeria welshimeri
3250	Listeria ivanovii	7310	Listeria seeligeri/welshimeri/innocua
3270	Listeria ivanovii	7311	Listeria welshimeri
3300	Listeria seeligeri / ivanovii	7320	Listeria grayi
3310	Listeria seeligeri	7330	Listeria grayi
3311	Listeria welshimeri	7500	Listeria innocua
3330	Listeria ivanovii	7510	Listeria innocua
3340	Listeria ivanovii	7511	Listeria welshimeri
3350	Listeria ivanovii	7520	Listeria grayi
3360	Listeria ivanovii	7530	Listeria grayi
3370	Listeria ivanovii	7701	Listeria welshimeri
3520	Listeria grayi	7710	Listeria welshimeri / innocua
3711	Listeria welshimeri	7711	Listeria welshimeri
3730	Listeria ivanovii	7720	Listeria grayi

## *Références bibliographiques*

- **Amgar A (1991)**. compte-rendu de la conférence internationale *Listeria* et sécurité alimentaire. Edition laval ASEPT ; 220 P
- **Anonyme 1. (1999)**. Le guide des aliments, Indispensable à tout amateur de cuisine. Éd Québec Amérique inc, canada, 219 pages.
- **Avril J. L. et Fauchère J.L. (2002)**. Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipse ; pp. 297-299.
- **Augustin J.C. (1999)**. Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de Doctorat, Université Lyon 1.
- **Baird- Parkera et Mayest (1991)**, Control by the application of HACCP.
- *Listeria et sécurité alimentaire (compte-rendus de la conférence internationale du 13-14 juin. 1991 à Laval, France)*, et Ed. Amgar., Asep, Laval, 174-180
- **Berche, P., (1999)**. physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *L.monocytogenes*. Infection Néonatale II., vol 2 (1) :33-39
- **Bergey (1986)**. Williams and Wilkins Baltimore.
- **Bille, (1989)**. Anatomy of a foodborne listeriosis outbreak. In : foodborne listeriosis, proceedings of a symposium on september 7, 1988 in Wiesbaden. B. Behr's GmbH and Co, Hzmberg, 29-396
- **Blanot S., Boumaila C et Berche. (1999)**. intracerebral activity of antibiotics against *listeria monocytogenes* during experimental rhombencephalitis. *j. antimicrob. chemother.*, 44,565-568.
- **Bourgeois C.M et Larpent J.P. (1986)**. Microbiologie alimentaire ; les fermentations alimentaire .Tom2 .Librairies Lavoisier TEC et DOC .paris 334 pages.
- **Cossart P., Pizarro-Cerda J et, Leccuit. (2003)**. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.*, **13**, 23–31.
- **Cottin J., Aubry C., Rive M et Carbobonnelle B. (1986)**. Recherche de *Listeria monocytogenes* dans des placentas de bovins prélevés lors d'avortements. In. Courtieu A.L., Espaze E.P., Reynayd A. E. (eds). Listériose, Listeria, Listeriosis Université de Nantes, 1985-1986, 300-304.

- **David C.** Listériose et avortements des bovidés. Bull. Soc.Vét. Prat. De France, 5, 279-288.
- **Delarras(2007):** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire.Ed.Lavoisier ; pp : 297-313.
- **Dousset X. et Prevost H, (2004) :** Maîtrise du développement de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé : intérêt de la biopréservation par des bactéries lactiques. Le lait, n°84, pp 135-144.
- **Eck A, et Gillis J.C. (1997) :** Le fromage de la science à l'assurance-qualité ; 3<sup>ème</sup> édition.Paris, Lavoisine : Technique et documents, 1997 : pp 7-8
- **FAO. (2004) :** Evaluation des risques liés à *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer ; série évaluation des risques microbiologique feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 6, 229-242.
- **Farber J.M et Peterkin P.I. (1991).** *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen *Microbiol. Rev.*, 55, 476-511.
- **Gaillard J.L., Gholizadeh Y et Pron B. (1995).** Diagnosis of human listeriosis: new approaches. *Med. Mal. Infect.*, 25, 251-256.
- **Hamdi T.M, Naim M, Martin P, Jacquet C(2007) :** Identification et caractérisation moléculaire de *Listeria monocytogenes* isolées dans le lait cru dans la région d'Alger (Algérie)
- **J.O.R.A.D.P, (1990) :** Journal Officiel de la république Algérienne démocratique et populaire. N°05(1990), Ministère du commerce.
- **Jacquet C, et Rocourt J(1993) :** Microbiologie des *Listeria* et épidémiologie de la listériose humaine. L'information du Bio technicien, T1, N°1,11-18.
- **Johnson J, L, Doyle M, P, Cassens R, G, et Schoeni J. L, (1988).** Fate of *Listeria*
- **Jorf (2006) Journal Officiel de la république Algérienne démocratique et populaire. N°35(1998),** Ministère du commerce.
- **Jouve, J.L, (1996) :** La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères, 2<sup>ème</sup> édition. Edition Polytechnica, Paris, pages 372-444. *Lait.* 84, 135–144
- **Kacem M., Zadi-Karam H., Dalache f. et Karam N.E. (2004).** Bacteriocine produites par *Lactococcus lactis* isolés à partir de lait de brebis de l'ouest Algérienne.

- **Kocks C., Gouin E., Tabouret M., Berche P., Ohayon H., Cossart P. (1992).** *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell*.68, 521-531.
- **Larpent, (2000).** *Listeria*.2<sup>ème</sup> édition. Technique et documentation, Lavoisier, 106 pages et annexes.
- **Larpent J.P, (2004).** *Listeria* .2<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. Paris. 157p.
- **Le Minor.et Verron M, (1990).** Bactériologie médical.2<sup>ème</sup> Ed. Flammarion ; 781p.
- **Lebres EA, (2006).** Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans laits crus dans la région centre .thèse doctorale.El-taref.151p.
- **Lebres. (2002).** Listériose bovine en Algérie, isolement et identification à partir du lait cru de vache. Thèse de magistère .institut des sciences vétérinaire Blida.105p.
- *Microbiol.*, **54**, 497-501.
- **Majdi A. (2009).** Séminaire sur les fromages AOP et IGP .INT-Ingénieur
- **Moll M .et Moll N, (2002).** Sécurité alimentaire du consommateur.1<sup>ème</sup> Ed. Lavoisier. Paris ; pp : 36-51
- **Nicola 1989, in Portalier, V., 2002.***L.monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Etude bibliographique, thèse de Doctorat en médecine Vétérinaire, n°139. Université Claude Bernard Lyon I, page 49.
- **Nickalus D, (2001) :** *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés. Etude bibliographique N°53.Ecole nationale vétérinaire. Lyon
- **Pinède L., Manquat G., Barnoud D., Croizé J., Guignier M et Stahl J.P., Micoudm. (1993).** Listériose neuroméningée de l'adulte. Aspects cliniques et apport du cotrimoxazole en monothérapie. *Presse Med.*, **22**,1385-1390.
- **Portalier V, (2002).** *Listeria monocytogenes* dans les laits et les produits laitiers : Etude bibliographique n°139. Thèse doctorale, Ecole national vétérinaire de Lyon, 168p.
- **Portalier, (2002).** *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Etude bibliographique N°139.Ecole national vétérinaire .Lyon.
- **Pradal M. (2012).** Transformation fromagère caprine fermière, Lavoisier.
- **Pujol-dupuy C. (2004) :** Accidents alimentaire d'origine bactérienne liée à la consommation de lait et des produits laitiers. Thèse doctoral, Ecole national vétérinaire de Lyon, 172p.
- **Richard C. Leroi F, Brillet a ., Rachman C., Connil N ., Drider D.,Pilet M. F et Onno B ., (2004).** Maîtrise du développement de *Listeria*



- **Richard J. (1983).** Nature de la flore microbiobienne dominante et sous dominante des laits crus très pollués, le lait, n°63, pp.148-17.
- **Rocourt J, (1996).** Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *Listeria monocytogenes* ; pp .746-756.
- **Rocourt J, Bille J.et Swaminathan B, (1999).** *Listeria*.7<sup>ème</sup> Ed ;pp :346-356.
- **Ryse et Marth.( 1991).** *Listeria* ,listériose and food safety.Marcel Dekker inc ,New-York,642 pages
- **Ryser, E.H et Marth, E.H., (1999).** *Listeria*, listeriosis, and food safety. Ryser E.T., Marth E.H. (Eds) secind édition, revised and expanded. Marcel Dekker Inc., N.Y., USA, pp 738.
- **Sautra L., Federighi M.et Jouve J (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire .Ed Polytechnica, pp : 133-162
- **Skovgaard N, et Morgen C, A, 1988.** Detection of *Listeria spp.* In feaces from animals.
- **Uyttendaele M.R., De Troy, P., and Debevere, J., 1999 .** Incidence of *L. monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *Int.J.Food Microbiol.*, 53 :75-80.
- **Veisseyre R, (1979).** Technologie du Lait. 3eme Edition, Maison Rustique, Paris.
- **Veronique P, 2002.** *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers thèse présentée à l'université de Claude- Bernard Lyon 1
- **Zaika L.L et Fanelli J.S, (2003).** Growth kinetics and cell morphology of *Listeria monocytogenes* Scott A as affected by temperature, NaCl, and EDTA. *J. Food.Prot.*, 66, 1208-1215.

#### Web graphie

- **Agence Française De Sécurité Sanitaire Des Aliments(2000)** Rapport de la commission *listeria* de l'AFSSA (page consultée le 28 octobre 2001). Adresse : <http://web.afssa.fr>
- **Euzéby (jp).** Bactériologie vétérinaire : les *Listeria*. [www.bactério.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html](http://www.bactério.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html).25 juin 2000, pp 1-35.