

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1**  
**INSTITUT DES SCIENCES VETERINAIRES**

## **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Microbiologie Médicale des Maladies Zoonotiques

RECHERCHE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS LE LAIT  
CRU DANS LA REGION DE L'EST DE L'ALGERIE  
(SETIF, BATNA, BISKRA)

Par

Hana Nedjma BELABED

Devant le jury composé de :

M. BACHIR-PACHA	Professeur	ISV-BLIDA	Président
D. KHELEF	Professeur	ENSV-ALGER	Examineur
A. HAKEM	M.C.A	Univ. DJELFA	Examineur
R.R TRIKI-YAMANI	M.C.A	ISV-BLIDA	Promoteur

Blida, Mai 2015

## RESUME

La listériose d'origine alimentaire est une maladie assez rare mais grave, qui affiche une mortalité élevée (20-30%) par rapport à d'autres pathogènes d'origine alimentaire, Elle est rares chez l'immuno-compétent, touchant essentiellement les âges extrêmes et la femme enceinte.

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

Notre travail dans sa partie pratique s'est intéressé à trois wilayas stratégiques à savoir Sétif, Batna et Biskra pour réaliser des prélèvements de lait crus bovin afin de mettre en évidence *Listeria monocytogenes*.

Pour cela, 252 prélèvements ont été collectés à partir de 09 points de vente, répartie sur trois communes étudiées à savoir, Bougaa, Djerma et Sidi Okba..

La recherche de la bactérie a été réalisée par la méthode normalisée NF EN ISO 11290-1.

Les résultats obtenus ont démontré la présence de *Listeria spp* au taux de 2.77% avec une prédominance de *L. innocua* (1.58%) et *L. monocytogenes* (1.19%) similaires à ceux rapportés par la littérature qui confirme que l'on n'est pas à l'abri d'une éventuelle épidémie.

Mots clés : Listériose d'origine alimentaire, *L. monocytogenes*, lait cru, bovin

## ABSTRACT

Foodborne Listeriosis is a rare but serious disease that has high fatality rates (20-30%) compared to other foodborne pathogens, are rare in immunocompetent, mainly affecting extremes of age and pregnant women.

To ensure consumer safety but also to deal with any episode with devastating consequences for public health, control of product contamination by *Listeria monocytogenes* is an obligation.

Our work in the practical part was interested in three strategic areas namely Setif, Batna and Biskra to achieve the bovine raw milk samples in order to identify *Listeria monocytogenes*.

For that 252 samples were collected from 09 bovine raw milk sales spread over the three municipalities studied namely (Bougaa, Djerma and Sidi Okba).

The research of the bacteria was performed by the standard method EN ISO 11290-1

The results showed the presence of *Listeria spp* rate 2.77 % with a dominance of *L. innocua* (1.58 %) and *L. monocytogenes* 1.(19 %) similar to those reported in the literature that confirms that we are not in shelter of a possible epidemic

Keyword: Foodborne Listeriosis, *Listeria spp.*, Raw milk, Bovine

## ملخص :

ينتقل المرض عن طريق الأغذية الليستيرية وهو مرض نادر الحدوث ولكنه خطير حيث أن معدلات الوفيات فيه عالية (20-30 %) مقارنة بمسببات الأمراض الأخرى المنقولة عن طريق الأغذية، وهي نادرة الحدوث عند الأشخاص الذين لهم مناعة جيدة ، وهي تؤثر بشكل رئيسي على الأشخاص كبار السن و الصغار، و النساء الحوامل. لضمان سلامة المستهلك ولكن أيضا للتعامل مع أي حلقة ذات عواقب وخيمة على الصحة العامة ، والسيطرة على التلوث المنتج من قبل الليستيريا المستوحدة هي واجب .

وكان بحثنا في جزئه العملي مهتما بالبحث عن هذه المسببات في ثلاثة مناطق استراتيجية وهي سطيف ، باتنة و بسكرة لتحقيق عينات الحليب الخام البقري من أجل تحديد الليستيريا المستوحدة .

لذلك 252 عينات تم جمعها من 09 نقاط لبيع الحليب الطازج موزعة على البلديات الثلاثة التابعة للولايات السبقة الذكر وهي ( بوقاعة ، جرمة و سيدي عقبة ) .

تم إجراء البحوث عن البكتيريا حسب الطريقة القياسية EN ISO 11290-1

أظهرت النتائج وجود الليستيريا بمعدل 2.77 % مع هيمنة *L. innocua* 1.58% و 1.19 % *L. monocytogenes* مماثلة لتلك الواردة في الأدبيات التي تؤكد أننا لسنا في مأوى عن وباء محتمل.

كلمات مفتاحية:

الأغذية الليستيرية, الليستيريا المستوحدة, الحليب الطازج

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur TRIKI-YAMANI R.R & Monsieur BACHIR- PACHA M. : je les remercie de m'avoir encadré, orienté, aidé et conseillé tout au long de mon travail.

Je remercie très sincèrement tous les membres du jury qui nous ont consacré de leur temps si sacré à la lecture et à l'évaluation de notre mémoire : Pr KHELEF Dj & Dr HAKEM A.

J'adresse mes sincères remerciements à toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté à me rencontrer et répondre à mes questions durant mes recherches spécialement le Colonel MAATOUK, le Commandant ZIDOUR, les ingénieurs Samira, Yasmina, Siham et Asma du Laboratoire Militaire d'Analyse des Denrées Animales et d'Origine Animale de Beaulieu (El-Harach).

Je désire aussi remercier Dr BELLALA Abdesselam mon mari, pour sa précieuse aide durant la réalisation de l'étude expérimentale.

Mes remerciements les plus profonds à tous mes Maîtres, du cycle primaire à la formation post-universitaire, qui m'ont inculqué le savoir et la connaissance.

## DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mon père : Mohamed.

Ma mère : BELMABROUK Lynda.

Ma grand-mère,

Mon mari, Abdesselam, mon fils Charef-Eddine.

Mes sœurs : Zahra et Amina.

Mon beau-père qui m'a tant soutenu.

Ma belle-mère qui m'a aidé à ne rien penser qu'à me concentrer sur la réalisation de ce mémoire.

Mes beaux-frères : Salah-Eddine qui n'a pas cessé de m'aider, Tarek

Mes belles-sœurs : Meriem et Zineb.

Mes oncles : Tarek, Zahreddine, Ikram, Khoudjia.

A mes amis : Imen, Sabrina, Nabila, Zohor, Amine, Majid.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	
REMERCIEMENTS & DEDICACES	
TABLE DES MATIERES	
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	
INTRODUCTION .....	01
CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE LA BACTERIE	
1.1 Historique.....	03
1.2 Taxonomie.....	06
1.3 Habitat.....	08
1.4 Caractères bactériologiques.....	09
1.4.1 Caractéristiques morphologiques.....	09
1.4.2 Caractères cultureux.....	10
1.4.2.1 Conditions de culture.....	10
1.4.2.2 Aspect des cultures.....	11
1.4.2.2.1 En milieu solide.....	11
1.4.2.2.2 En milieu liquide.....	12
1.4.3 Caractères biochimiques .....	12

1.5- Physiologie de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
1.6 Pouvoir pathogène.....	20
1.6.1 Pouvoir pathogène naturel.....	20
1.6.2 Pouvoir pathogène expérimental .....	23
1.6.2.1 In vivo.....	23
1.6.2.2 In vitro.....	25
1.7 Virulence de <i>L. monocytogenes</i> .....	26
 <b>CHAPITRE 2 : LAIT CRU ET LISTERIA</b>	
Contamination du lait cru par listeria.....	27
 <b>CHAPITRE 3 : LISTERIOSE A <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	
3.1 Physiopathologie .....	29
3.2 Maladie chez l'animal.....	29
3.3 Maladie chez l'homme.....	34
3.4 Immunité.....	39
3.5 Prévention de listeria .....	40
 <b>CHAPITRE 4 : METHODES DE RECHERCHE DE <i>L. MONOCYTOGENES</i></b>	
4.1 Méthode de routine AFNOR NF V 08 055.....	42
4.2 Méthode normalisée NF EN ISO 11290-1.....	43
4.3 Méthode " <i>Rapid'L.Mono</i> ".....	43



4.4 La méthode LISTERSCREEN.....	44
4.5 Méthode Polymérase Chain Réaction (PCR).....	44
4.6 Méthode VIDAS® LDUO.....	45
4.7 Tests d'identification rapide.....	45
4.8 Sous-typage de <i>L. monocytogenes</i> .....	46
4.8.1 Sérotypie.....	46
4.8.2 Lysotypie .....	47
 <b><u>Synthèse bibliographique</u></b>	
<b>CHAPITRE 5 : PARTIE EXPERIMENTALE</b>	
5.1-Matériel et méthodes.....	49
5.2-Résultats et discussion.....	58
 CONCLUSION .....	 73
RECOMMANDATIONS .....	74
REFERENCES .....	76
ANNEXE.....	87

## LISTE DES ILLUSTRATIONS ET TABLEAUX

### LISTE DES PHOTOS

01 & 02	Lister John & Murray E.G.D.	06
---------	-----------------------------	----

### 1- LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Evolution de la taxonomie des <i>Listeria</i>	07
Figure 1.2	Microscopie électronique de <i>L. monocytogenes</i>	09
Figure 1.3	Différenciation des espèces de <i>Listeria</i>	16
Figure 1.4	Différentes étapes d'infection cellulaire de <i>L. monocytogenes</i>	21
Figure 1.5	Comètes d'actine en microscopie électronique	22
Figure 1.6	Comète d'actine <i>L. monocytogenes</i> (Vert: actine, Rouge: bactérie)	22
Figure 1.7	Représentation schématique des étapes du cycle d'infection cellulaire de <i>L. monocytogenes</i> et facteurs bactériens associés	23
Figure 3.1	Prévention contre <i>Listeria</i> spp.	40
Figure 5.1	Etapes de la méthode ISO 11290-1	53
Figure 5.2	Fréquence de <i>Listeria</i> spp dans le lait cru	58
Figure 5.3	Fréquence mensuelle de <i>Listeria</i> spp.	59
Figure 5.4	Fréquence de <i>Listeria</i> spp par saison.	60
Figure 5.5	Fréquence de <i>L.monocytogenes</i> et <i>L.innocua</i> dans le lait cru.	60
Figure 5.6	Fréquence de <i>Listeria</i> spp par région.	61
Figure 5.7	Fréquence de <i>Listeria</i> spp en fonction de la saison	62
Figure 5.8	Traitement des données de fréquence de <i>Listeria</i> spp Vs saison.	63

### 2- LISTE DES TABLEAUX

Tabl.1.1	Composition du milieu synthétique pour <i>L. monocytogenes</i>	10
Tabl.1.2	Principaux caractères biochimiques du genre <i>Listeria</i>	14
Tabl.1.3	Caractères différentiels de <i>Listeria</i> et les bactéries proches	14
Tabl.1.4	Caractères biochimiques différentiels des espèces de <i>Listeria</i>	14
Tabl.1.5	Croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> à différentes températures en bouillon trypticase soja	17
Tabl.1.6	Temps de génération de <i>Listeria monocytogenes</i>	19
Tabl.3.1	Principales manifestations cliniques de la listériose chez les différentes espèces animales	32
Tabl.4.1	Sérotypes associés aux lignées génétiques de <i>L. monocytogenes</i>	46
Tabl.5.1	Répartition des prélèvements sur les trois communes étudiées.	49
Tabl.5.2	Lecture & Interprétation de caractères sur galerie API <i>Listeria</i> spp	57
Tabl.5.3	Résultats des analyses bactériologiques et taux de <i>Listeria</i> spp	58
Tabl.5.4	Fréquence de <i>Listeria</i> spp par saison.	59
Tabl.5.5	Fréquence de <i>L. monocytogenes</i> et <i>L. innocua</i> .	60

## INTRODUCTION

Le lait est en soit un milieu complet et idéal pour la croissance microbienne. Lorsque il 'est sécrété de la vache, il est théoriquement stérile. Cependant, une première contamination se produit lors de son passage dans le canal du pis qui peut être minimisé par une bonne désinfection de celui-ci avant la traite. Néanmoins, tout au long de la chaîne de production, que ce soit à la ferme ou à l'usine, la contamination est inévitable.

Même avec toutes les précautions « l'entreposage au froid combiné à la traite mécanique en conservant la chaîne de froid » le lait cru se retrouve quand même contaminé lors de sa production et de sa manipulation de façon plus ou moins importante. MORSE et al. [1] ont rapporté qu'un lait provenant d'une vache dont la mamelle a été désinfectée, présente un nombre réduit de contaminants. Les équipements de collecte, de transport et le traitement du lait constituent la source majeure de contamination du lait [2]. Cette contamination peut avoir des conséquences allant de la simple altération du produit causé par les bactéries dites d'altération, lui faisant perdre ses qualités organoleptiques et sa valeur commerciale, à l'apparition de toxi-infections graves plus communément appelées empoisonnements alimentaires mettant en cause les bactéries pathogènes. Parmi les bactéries pathogènes retrouvées dans le lait, *Listeria monocytogenes*, est responsable d'infections graves chez les consommateurs. *Listeria monocytogenes* est l'agent causal de la listériose humaine, une infection fatale d'origine alimentaire. Les manifestations cliniques varient des gastro-entérites fébriles à des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombencéphalites, infections prénatales et avortements. Différemment des autres pathogènes des infections d'origines alimentaires, la listériose est associée à des cas de mortalité qui peuvent atteindre des valeurs de 20-30% [3].

En Algérie, ces dernières années l'élevage des vaches laitières commence à s'étendre, alors que peu d'études ont été conduites sur la *Listeria*.

Ce travail vise justement à mettre en évidence la présence de *Listeria* dans le lait cru bovin. Soulevant une attention particulière vu les risques encourus en cas

d'épidémie de Listériose, c'est dans cette optique nous avons entrepris une recherche bactériologique systématique concernant le lait cru vendu dans les points de ventes situés dans les communes des trois wilayas étudiées à savoir Sétif (Bougaa), Batna (Djerma) et Biskra (Sidi Okba).

Il est évident, qu'une épidémie de Listériose coûterait plus cher que des actions de prévention. Bien que la fréquence de cette bactérie reste faible en Algérie [4], elle n'exclut pas la Recherche et l'intensification des enquêtes, sachant que les habitudes alimentaires concernant le lait dans certaines régions d'Algérie notamment les villages, repose sur la consommation du lait dans son état cru d'une part, et d'autre part la non disponibilité du lait pasteurisé subventionné ce qui oblige une grande partie de la population villageoise à en acheter et à en consommer souvent à l'état cru ou sous une autre forme tel que l'ben.

L'intérêt de la recherche de *L. monocytogenes* est confirmé par l'importance que lui accorde le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire (JORADP) N° 3, arrêté du 21 Châabane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

La problématique posée par notre travail peut être résumée par les points énumérés ci-après :

- ❖ Un réservoir large et une distribution ubiquitaire.
- ❖ Une bactérie aux propriétés particulières.
- ❖ Une infection difficile à diagnostiquer.
- ❖ Une bactérie difficile à traiter.
- ❖ Une infection grave qui peut être mortelle dans 20 à 30 % des cas

Même si le JORADP via le Ministère du commerce, arrête au 21 Chaâbane 1426 (correspondant au 25 septembre 2005) une méthode obligatoire de recherche de *L. monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers, l'évaluation du risque *Listeria* reste malheureusement insuffisante, compte tenu de la nature et du nombre d'études réalisées à ce jour.

## CHAPITRE 1 : PRESENTATION DE LA BACTERIE

### 1.1- Historique

Listeria doit son nom à la mémoire du Docteur John Lister. Elle est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes chez son hôte d'où son nom de monocyto-genes.

La découverte de *Listeria monocytogenes*, responsable de listériose humaine et animale, date du début du XX<sup>ème</sup> siècle.

- En 1911, HÜLPHERS, vétérinaire Suédois, fut le premier auteur à avoir décrit cette infection chez un lapin atteint de méningite.
- En 1918, DUMONT et COTONI isolèrent une bactérie ressemblant à *Erysipelothrix rhusiopathiae* du liquide céphalorachidien d'un soldat servant en France atteint de méningite. Cette bactérie fut conservée à l'Institut Pasteur de Paris et identifiée en 1940 comme étant *L. monocytogenes*.
- En 1924, MURRAY et al., durant leur investigation expérimentale sur les animaux, isolèrent une bactérie des ganglions lymphatiques des animaux affectés. Quand ces bactéries sont injectées à des animaux sains, elles induisent une monocytose. Ils lui accordent le nom de *Bacillus monocytogenes*.
- En 1926, c'est la première description de ce petit bacille par MURRAY, WEBB et SWANN. Ils isolèrent un germe à Gram positif du sang des lapins et des cobayes qui représentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent le nom *Bacterium monocytogenes*.
- En 1927, en Afrique du Sud, PIRIE qui étudiait le portage de *Yersinia pestis* par les rongeurs, isola la même bactérie des foies des espèces de gerbille africaine, sous le nom de *Listerella hepatolytica*. Cette bactérie était non distinguable de *B. monocytogenes*. Plus tard, Pirie proposa le nom de *Listeria monocytogenes*.
- En 1929, NYFELD isola une bactérie qu'il nomma *Bacterium monocytogenes hominis* à partir d'hémocultures de patients atteints de fièvre ganglionnaire, et il fut convaincu qu'il a isolé l'agent causal de la mononucléose infectieuse.
- En 1933, BURN démontre le rôle de la bactérie dans l'infection périnatale.
- *Bacterium monocytogenes* et *Listerella hepatolytica* semblant être le même organisme, le nom de *Listerella monocytogenes* fut proposé et conservé jusqu'en

1939. On se rendit compte alors que le nom de *Listerella* était déjà utilisé pour désigner un champignon et en 1940, le nom de *Listeria monocytogenes* fut officiellement adopté.

- A partir de 1951, REISS, POTEL et KREBS (allmend) décrivirent la forme septicémique du nouveau-né, et les travaux du Seeliger ont montré que *Listeria monocytogenes* joue un rôle assez important aussi bien en pathologie humaine qu'en pathologie animale.
- En 1960, les infections humaines à *Listeria* ont été diagnostiquées.
- En 1981, la première mise en évidence de la transmission alimentaire de la listériose humaine fut établie [5 6, 7]
- En 1983 à Boston, 49 personnes dont 14 morts parmi lesquels 14 % étaient des cas périnataux, ayant pour origine un lait pasteurisé sans aucune confirmation.
- Entre 1983 et 1987 en Suisse, 122 cas, dont 34 morts, ayant pour origine, un fromage à pâte molle (Vacherin Mont-d'Or) sont contaminés par *Listeria monocytogenes*
- En 1984/85, en Californie du Sud, 142 cas dont 48 morts parmi lesquels 85% étaient des cas périnataux, ayant pour origine des fromages frais de type Mexicain, fabriqués aux USA à partir de lait américain provenant d'un troupeau infecté.
- En 1987 à Philadelphie, 32 cas dont 11 morts. La cause ne fut jamais identifiée.
- En 1988 aux Massachusetts, 56 cas et une quarantaine de cas en 1983 ayant pour origine probable un lait pasteurisé.
- En 1992, en France, 279 cas de listériose dont 63 décès ayant pour origine la langue de porc en gelée.
- En 1993, 39 cas ont encore été recensés en France suite à la contamination par des rillettes.
- En 1995, en France, 20 cas dont 4 décès. ayant pour origine un fromage appelé "Le Brie de Meaux".
- En 1997, en France, 15 cas dont 2 morts, lors d'un avortement et un enfant mort à la naissance, ayant pour origine des fromages à pâte molle.
- En 1998, aux Etats-Unis d'Amérique, 100 cas d'infection dont 20 mortels comprenant 2 avortements, ont été recensés dans 11 Etats (notamment en

Ohio, à New York, au Tennessee, au Massachusetts, en Virginie-Occidentale, au Michigan, au Connecticut, en Oregon, Vermont et en Géorgie). Des saucisses de type hot-dog étaient la source de l'infection. Le 22 décembre, le fabricant Bill Mar Food, a volontairement rappelé des lots de production particuliers de saucisses (15 millions de livres) et d'autres produits de viande pouvant être contaminés.

- En 2000 et le 06 Mai le Président Clinton, a prononcé devant le congrès américain à la maison blanche (Washington), un discours relatif à la stratégie globale de prévention et de lutte contre *Listeria monocytogenes* particulièrement dans les hot dogs et ce suite au rapport du CDC.
- En Algérie ont été décrits les cas rapportés par LABRES (2006) et, le premier cas clinique de listériose humaine par BENALLEGUE et al 1967. BELLOUNI (1989) a isolé 11 souches de *Listeria*, réparties comme suit : 2 *L.monocytogenes*, 1 *L. welshimeri*, 2 *L. seeligeri* et 6 *L. innocua* à partir de 87 placentas de bovins, et 1 souche de *L. innocua* à partir de 16 fromages analysés. RAMDANI (1999), 5 cas humains. NAIM (2000) (Hôpital Central de l'Armée), 1 cas humain. LABRES(2000): 10 souches de *Listeria* dont 7 *L. monocytogenes* et 3 *L.innocua* à partir de 419 échantillons de denrées alimentaires autres que le lait. Labres et Guetarni (2004) : 28 souches de *Listeria* dont 10 *L. monocytogenes*, 17 *L. innocua* et 1 *L. ivanovii* à partir de 1432 échantillons de lait cru.



Photo 01: LISTER John

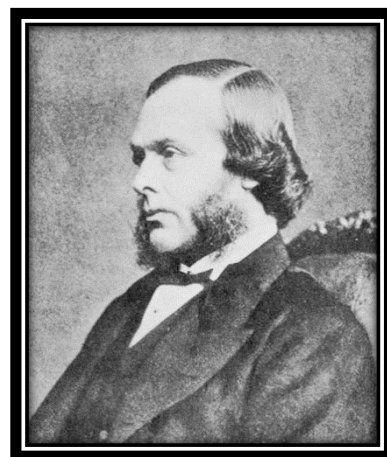


Photo 02: MURRAY E.G.D.

## 1.2- Taxonomie

Dans l'édition du Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology de 1986, le genre *Listeria* fait partie des bacilles à Gram positif réguliers et non sporulés avec *Lactobacillus*, *Erysipelothrix* et *Brochothrix*. A cette époque, le genre *Listeria* comprenait huit espèces : *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* et *L. denitrificans*. Les trois dernières étant considérées comme espèces de statut taxonomique incertain [5].

Dans les années qui suivent, six espèces sont reconnues dans le genre *Listeria* :

- *L. monocytogenes*
- *L. ivanovii*
- *L. seeligeri*
- *L. innocua*
- *L. welshimeri*
- *L. grayi*

*Listeria denitrificans* a été connue comme *Jonesia denitrificans*. *Listeria murrayi* et *L. grayi* sont toutefois considérées suffisamment distinctes des autres *Listeria spp*, ce qui a justifié la création du nouveau genre *Murraya*. Mais actuellement ils sont attribués à une seule espèce *L. grayi*. Plus récemment, *L. ivanovii* a été divisée en deux sous espèces : *ivanovii* et *londoniensis*. Parmi les espèces non-monocytogenes, seulement *L. ivanovii* est reconnue comme pathogène humain [7.8] Selon Larpent [9], l'évolution de la taxonomie des *Listeria* a démontré que ce genre est constitué de deux branches distinctes :

- L'une comprenant *L. monocytogenes* et les espèces génomiquement proches : *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri*,
- La seconde comprenant uniquement *L. grayi*.

En 2008 et 2010, deux nouvelles espèces, *L. marthii* et *L. rocourtiae* ont été isolées et caractérisées [10.11].

La classification hiérarchique du genre *Listeria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S et est représentée comme suit [12].



Empire : Procaryote  
 Domaine ; Eubactera  
 Phylum : Firmicuts  
 Classe : Bacilli  
 Ordre : Bacillales  
 Famille : Listeriaceae  
 Genre : Listeria

Selon GILLESPIE et HAWKEY [7] *Listeria* était considérée, comme membre de la famille des *Corynebacteriaceae*, à cause de ces caractères morphologiques. Les études chimio-taxonomiques ont démontré que *Listeria* était tout à fait distincte des *corynébactéries*. Le séquençage partiel du gène ARNr 16S confirmait clairement la place phylogénétique du genre *Listeria* dans le groupe de *Clostridium-Bacillus-Lactobacillus*, dans le proche voisinage de *Brochothrix thermosphacta*.

Dans la seconde édition du Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology de 2009, la position systématique du genre *Listeria* est résolue. Les *Listeria* appartiennent au phylum des Firmicutes et sont apparentées au genre *Brochothrix*. Ces deux genres sont rassemblés au sein de la famille des Listeriaceae [13].

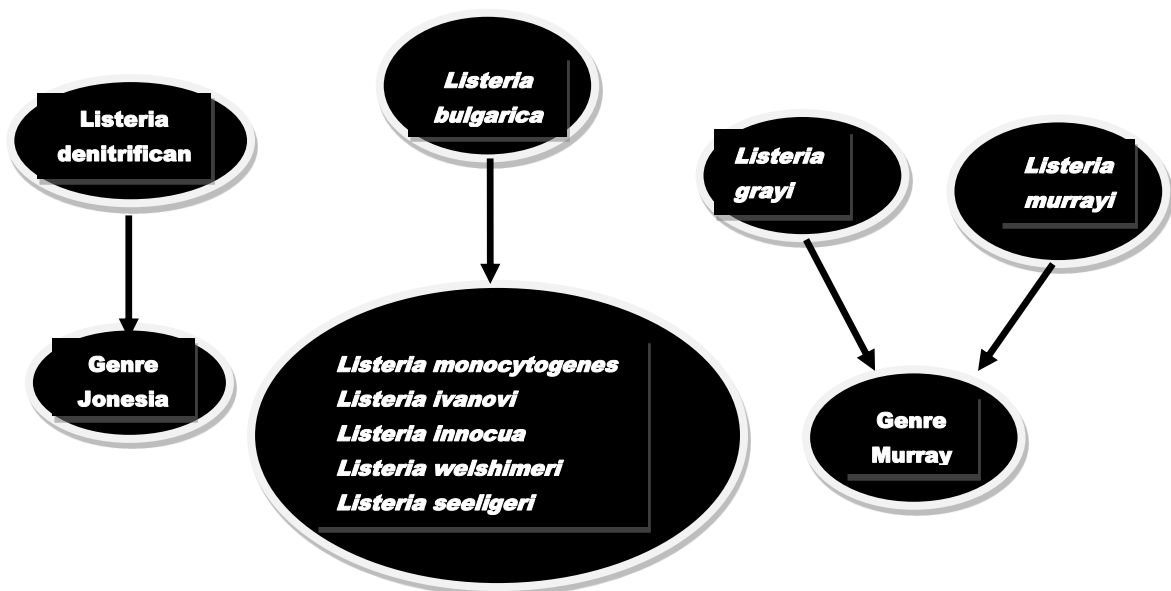


Figure 1.1 : Evolution de la taxonomie des *Listeria* [14]

### 1.3- Habitat

*L. monocytogenes* est présente dans l'environnement. On peut dire qu'elle n'est qu'accidentellement pathogène pour l'homme et les animaux. Son biotope naturel est le sol, où elle se développe en saprophyte sur des végétaux en décomposition, et elle est capable de survivre plusieurs mois voire plusieurs années. La durée de survie dépend des caractéristiques physico-chimiques et du taux d'humidité du sol. Elle est principalement rencontrée dans les aliments végétaux crus et les produits à base de lait cru. Mais, tous les types de denrées peuvent être contaminés comme en témoignent les épidémies récentes dues à des produits de charcuterie. Donc, les animaux fermiers et leur environnement peuvent présenter une importante source de contamination de l'aliment et d'infections pour l'homme [5.15.16].

Le sol est souvent considéré comme la source de contamination, particulièrement les sols agricoles fertiles qui reçoivent du matériel végétal en décomposition, des déjections animales et des épandages. L'étude de WEISS et SEELIGER (1975) en Allemagne, montre que *L. monocytogenes* est présente dans de multiples échantillons de plantes : champs de blé, de maïs (prévalence : 9,7 %), de céréales (13,3 %), de cultures maraîchères (12,5 %), jachères (44 %), prairies et pâtures (15,5 %), forêts (21,3 %) et les zones de fréquentation d'animaux sauvages (23,1 %) [17].

*L. monocytogenes* est rencontrée dans l'eau et également dans le tube digestif de nombreux animaux. On la trouve aussi dans les matières fécales et les ensilages et elle est susceptible de contaminer les aliments. Le portage intestinal asymptomatique de *L. monocytogenes* est relativement fréquent aussi bien chez l'homme (5 à 10% des individus) que chez les animaux d'élevage (par exemple de 10 à 15% chez les bovins). *L. monocytogenes* est capable de survivre très longtemps dans les fèces d'animaux (entre 6 mois et plus de 5 ans). Les matières fécales animales ou humaines représentent donc une source de contamination de l'environnement naturel (sol et eaux) [5.18.19]

Les *Listeria spp.* sont des bactéries résistantes dans le milieu extérieur (survie de 1 à 2 ans dans le sol, 21 mois dans du lait naturellement contaminé, 1 à 18 mois dans les fèces, 6 mois dans la paille), très largement répandues dans l'environnement (sols, végétaux, pâturages, eaux douces, eaux de mer, vase, eaux d'égouts), dans les locaux d'élevage (litière, sol, parois, fenêtres, mangeoires, abreuvoirs, etc.) et

dans les locaux d'habitation (torchons, serpillières, périphérie des conduites d'évacuation, réfrigérateurs et même brosses à dents) [20].

## 1.4 Caractères bactériologiques

### 1.4.1 Caractéristiques morphologiques

Les *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. Ce sont des bactéries à Gram positif, non acido-résistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives mais cultivant mieux en aérobiose et mobiles lorsqu'elles sont cultivées à 20 °C (ciliature péritriche), immobile à 37° C. (Fig. 1.2), se présentant de manière isolée ou groupés en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes ou petits amas.

*Listeria* est positive à la réaction au rouge de méthyle et à la réaction de VOGES-PROSKAUER. [21]

Certaines souches de *L. monocytogenes* ne sont pas soumises à l'influence de la température car elles restent mobiles à 37°C [22].

Le pourcentage en G + C des espèces de *Listeriae* est compris entre 36 et 42. La paroi renferme des acides téichoïques et lipotéichoïques, les acides mycoliques sont absents, les acides gras sont saturés et non ramifiés.

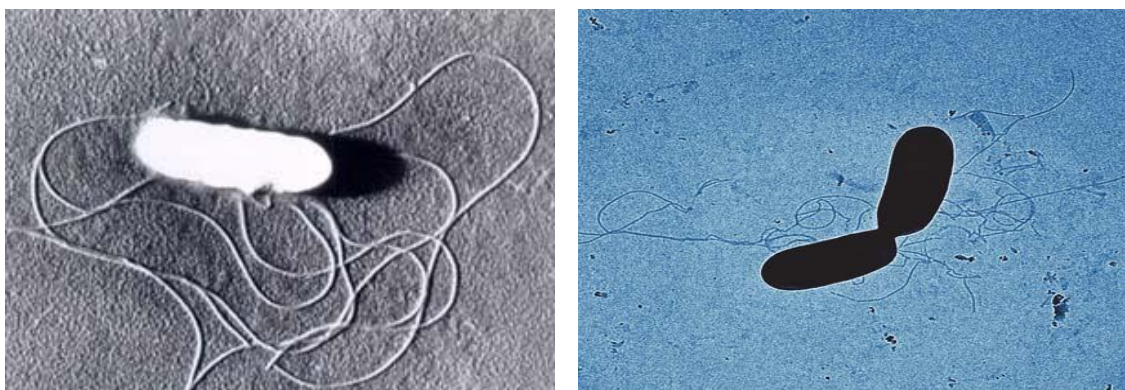


Figure 1.2 : Microscopie électronique de *L. monocytogenes* [23].

## 1.4.2 Caractères cultureux

### 1.4.2.1 Conditions de culture

La connaissance du métabolisme bactérien montre que *Listeria* se cultive facilement sur les milieux de culture courants. Cependant une supplémentation en tryptose, en glucose (0,2-1 %), en sang (0,5%) ou en sérum favorise sa croissance. D'autres composants stimulateurs sont connus.

- Adénine, Thymine, Cytosine, Guanine (2,5mg/L).
- Hémine (50 mg/L).
- Fer.

Le tableau 01 est une synthèse de tous ces éléments.

Tableau 1.1: Composition du milieu synthétique pour *Listeria monocytogenes* [24].

Composants	Quantité / Litre
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,56 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	30,96 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,41 g
Citrate ferrique	0,088 g
Glucose	10,0 g
L-Leucine	0,1 g
L-Isoleucine	0,1 g
L-Valine	0,1 g
L-Méthionine	0,1 g
L-Arginine	0,1 g
L-cystéine	0,1 g
L-glutamine	0,6 g
Riboflavine	0,5 mg
Thiamine	1,0 mg
Biotine	0,5 mg
Acide Thiocétique	0,005 mg

*L. monocytogenes* se développe mieux sous tension réduite en oxygène. L'emploi de

la fraction membranaire réduisant l'oxygène (oxyrase) dérivée de *E. coli*, à cette fin, été utilisée dans la méthode FDA [25.26]

*L. monocytogenes* se développe de 1 à 45°C avec un optimum compris entre 30 et 37°C.

La résistance de *L. monocytogenes* aux agents physiques et chimiques est étonnante pour un germe non sporulé : les cultures restent viables plusieurs mois à la température du laboratoire, et plusieurs années à +4°C. Elles résistent à un chauffage de 55°C pendant 30 minutes [27]

*L. monocytogenes* se développe à pH=5, 6 à 9,6 avec un optimum compris entre 7,2 et 7,6 (légèrement alcalin) [28]

*L. monocytogenes* survit à l'action d'agents hostiles, même à des concentrations élevées (10% NaCl, 40% bile, 0,5% tellurite de potassium) [29]

La bactérie se développe quand le milieu de culture contient 0,025% d'acétate de thallium, 3,75% de Thiocyanate de potassium, 0,01% de chlorure de 2, 3,5-Triphényl-tétrazolium [30.31]

#### **1.4.2.2- Aspect des cultures**

##### **1.4.2.2.1- En milieu solide :**

Après 24 heures d'incubation, les cultures apparaissent sous formes de petites colonies de 1 mm de diamètre, lisses (S), à bords réguliers et transparentes, d'une couleur légèrement ardoisée en lumière normale. Examinées en trans-illumination oblique (technique de Henry), elles ont une coloration caractéristique bleu-vert [21. 31.32.33].

Après quelques jours, les colonies s'opacifient et s'élargissent (2 à 4 mm), leurs bords sont nettement surélevés par rapport au centre. Des colonies à l'aspect rugueux (R) peuvent se développer. Ces colonies sont plus larges, plus ternes et plus plates tout en ayant un aspect plus onduleux [21].

Sur gélose au sang de cheval ou de mouton, on observe, après 24H d'incubation à 37°C, une zone étroite et diffuse d'hémolyse de type  $\beta$ .

*L. monocytogenes* est également hémolytique pour les globules rouges de lapin et d'homme. Ce caractère est intimement lié à la pathogénicité des souches [32.33.31.34]

La mise en évidence de ce caractère est importante car elle permet :

- d'une part, de faire la différence entre les espèces,
- d'autre part, de faire la distinction avec les souches non hémolytiques, donc non virulentes.

Dans d'autres cas litigieux parfois, on aura recours au Camp-test, qui permet de confirmer ou d'infirmier l'hémolyse.

Toutes ces cultures ont une odeur aigrelette qui rappelle l'odeur du babeurre [24]

#### 1.4.2.2 En milieu liquide

Dans un bouillon nutritif au glucose, un trouble homogène et intense se développe en 18 heures. En quelques jours, il se produit un précipité épais et visqueux qui, si la culture se poursuit, devient fort difficile à désagréger.

Ces cultures apparaissent toujours dans les premières phases de mise en évidence du genre *Listeria* dans un substrat [24].

#### 1.4.3 Caractères biochimiques

- Métabolisme réducteur et respiratoire

*Listeria* spp est catalase +et oxydase-, citrate -.

*Listeria* ne réduit pas les nitrates en nitrites.

*Listeria* est aéro-anaérobie facultative avec une tendance microaérophile, Sa croissance est donc favorisée sous des tensions réduites en oxygène [35].

- Métabolisme des substances protéiques

Le germe n'est pas protéolytique ; il ne dégrade pas la gélatine, ni la caséine, ni le sérum coagulé [36].

Le lait tournesolé est acidifié lentement, non coagulé ; le tournesol est réduit rapidement, sauf en surface où il reste coloré.

Listeria ne produit pas d'indole, ni d'hydrogène sulfuré ; elle ne possède pas de phénylalanine désaminase, ni de décarboxylase d'acides aminés, ni d'Uréase.

La bactérie possède une phosphatase alcaline mais pas de sulfatase [36].

*L. monocytogenes* quant à elle, exige la biotine, riboflavine, thiamine, acide thiocique et plusieurs acides aminés (Cystéine, Glutamine, Isoleucine, Leucine et Valine) [29]. Arginine, histidine, méthionine et tryptophane ne sont pas indispensables mais sont stimulateurs de la croissance du germe.

- Métabolisme des substances glucidiques

Le catabolisme du glucose peut s'effectuer de façon aérobie ou anaérobie, en empruntant la voie d'Embden-Meyerhof. Dans le premier cas il aboutira à la production de pyruvate, d'acide lactique et d'acétoïne ; dans le second cas, on obtiendra principalement de l'acide lactique (L +) [36].

Les réactions au rouge de méthyle et de Voges-Proskauer sont positives.

Parmi les hydrates de carbone, certains sont fermentés sans production de gaz par toutes les espèces de *Listeria* : amygdaline, cellobiose, esculine, fructose, glucose, mannose, rhamnose, tréhalose et salicine. Ces molécules sont dégradées en 48 heures, par contre le maltose est dégradé en 4 jours, la dextrine en 8 jours, l' $\alpha$ -méthyle-D glucoside en 2 à 6 jours et le glycérol en 10 jours [29].

Certains glucides ne sont presque jamais fermentés; c'est le cas de l'adonitol, l'arabinose, du dulcitol, de l'érythritol, du glycogène, de l'inositol, de l'inuline, du mannitol, du raffinose et du sorbose [30].

L'acidification se produit tardivement avec le lactose, le mélézitose, le saccharose et la dextrine [30].

D'autre part, certaines fermentations glucidiques étant variables d'une espèce à l'autre et parfois même d'une souche à l'autre, elles sont utilisées pour différencier les espèces, en association avec le test de CAMP. C'est le cas du galactose, du lactose, du mélézitose, du rhamnose, du sorbitol, du sucrose, de la xylose et de l'amidon. Les principaux caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont consignés dans le tableau 02.

Tableau 1.2: Principaux caractères biochimiques du genre *Listeria* [32].

Reactions positives	Reactions negatives
Catalase	Oxydase
Glucose	Gaz en Glucose
VP, RM	Uréase
Esculine	Indole
Type respiratoire : aéro-anaérobie	Gélatinase
Réduction du lait tournesolé	H <sub>2</sub> S

Dans les cas où l'hémolyse n'est pas bien visible sur gélose au sang, ou encore dans les cas litigieux, on peut avoir recours au Camp Test (Christie-Atkins-Munch-Peterson-Test). Ce dernier a été proposé pour une meilleure distinction entre la souche hémolytique et non hémolytique [36.31]

C'est le cas de *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* et *Listeria seeligeri*. Leurs cultures en présence de sang en milieu solide montrent donc des zones d'hémolyse dont les marges ne dépassent pas celles des colonies [36].

Le diagnostic biochimique différentiel entre les espèces de *Listeria* et les bactéries proches figure dans le Tableau 1.3.

Tableau 1.3 : Caractères différentiels de *Listeria* et les bactéries proches [32,37].

	<i>Listeria</i>	<i>Erysiplothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
Mobilité à 25°C	+ (a)	-	-	- (+)
Catalase	+	-	+	-
Esculine	+ (b)	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	+	-	-
Lait tournesolé - coagulation	- +	- -	- -	+ +
Corpuscules métachromatiques	-	-	+	-

a)- immobile ou peu à 37°C

b) Réaction positive en 2 heures Les principaux caractères biochimiques correspondant aux différentes espèces de *Listeria* figurent dans le Tableau 4.1.

Tableau 1.4 : Caractères biochimiques des espèces de *Listeria* [7.30.15].



Caractéristiques	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>Jonesia denitrific</i>
Bâtonnets irréguliers	-	-	-	-	-	-	-	+
β-hémolyse	+	-	+	-	-	-	-	-
Camp-test								
• <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
Production d'acide à partir de :								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Listeria-arabinose	-	-			-	-	-	+
Dextrine	±	-			-	+	+	+
Galactose	±	-			±	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+	+	
Glycogène	-	-			-	-	-	+
Lactose	±	+			+	+	+	+
D-Lyxose	-	-			-	+	+	
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Mélezitose	±	±			±	-	-	-
Mélibiose	-	-			±	-	-	-
α-Méthyl-D-glucoside	+	+			+	+	+	-
α-Méthyl-D-mannoside	+	+	-	+	-			
Listeria-Rhamnose	+	±	-	±	-	-	±	-
Sorbitol	±	-			-	-	-	-
Amidon soluble	-	-			-	+	+	
Saccharose	-	±			±	-	-	+
D-xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-tagatose	±	±	±	±	-	-	-	
D-turanose	±	±	±	±	±	-	+	
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyse de :								
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-			-	-	-	+
Hippurate	+	+			+	-	-	-
Amid	±	±			-	-	-	+
Lécithinase	+	+			+	+	+	+
Lécithinase	±	±			+	-	-	-
Phosphatase acide ( APIZym )	+	+	+	+	+	-	-	-
Phosphoamidase ( APIZym )	+	+	+	+	+	-	-	
Réduction de NO <sub>3</sub> en NO <sub>2</sub>	-	-			-	-	+	+
Pathogénicité pour la souris	+	-	-	-	+	-	-	+
G + C ( % mol )	37-	36-38	36	36	37-38	41-	41-	56-

En définitive, et comme le décrit si bien LARPENT [29] :« La caractérisation phénotypique de *Listeria monocytogenes* fait appel aux méthodes classiques

d'identification bactérienne: bacille Gram+, catalase<sup>+</sup>, oxydase<sup>-</sup>, mobilité à 20°C, (β-hémolyse sur gélose au sang, D-xylose<sup>-</sup>, D-mannitol<sup>-</sup>, L-rhamnose<sup>+</sup>, α-méthyl-D-mannoside<sup>+</sup>. Cette bactérie ne possède pas de nitrate réductase, fermente le glucose sans gaz, hydrolyse l'esculine, ne produit pas d'indole, ni d'H<sub>2</sub>S. Elle est uréase<sup>-</sup> et non protéolytique (gélatine<sup>-</sup>), phosphatase alcaline<sup>+</sup>. L'arabinose, le lactose, le mélézitose, le saccharose et la dextrine sont tardivement fermentés ou négatifs. Xylose, raffinose, inositol, dulcitol, mannitol, adonitol ne sont pas fermentés. Le citrate de Simmons n'est pas utilisé ».

Le diagnostic biochimique différentiel entre les espèces de *Listeria* peut être également facilité par l'utilisation de la clé dichotomique suivante :

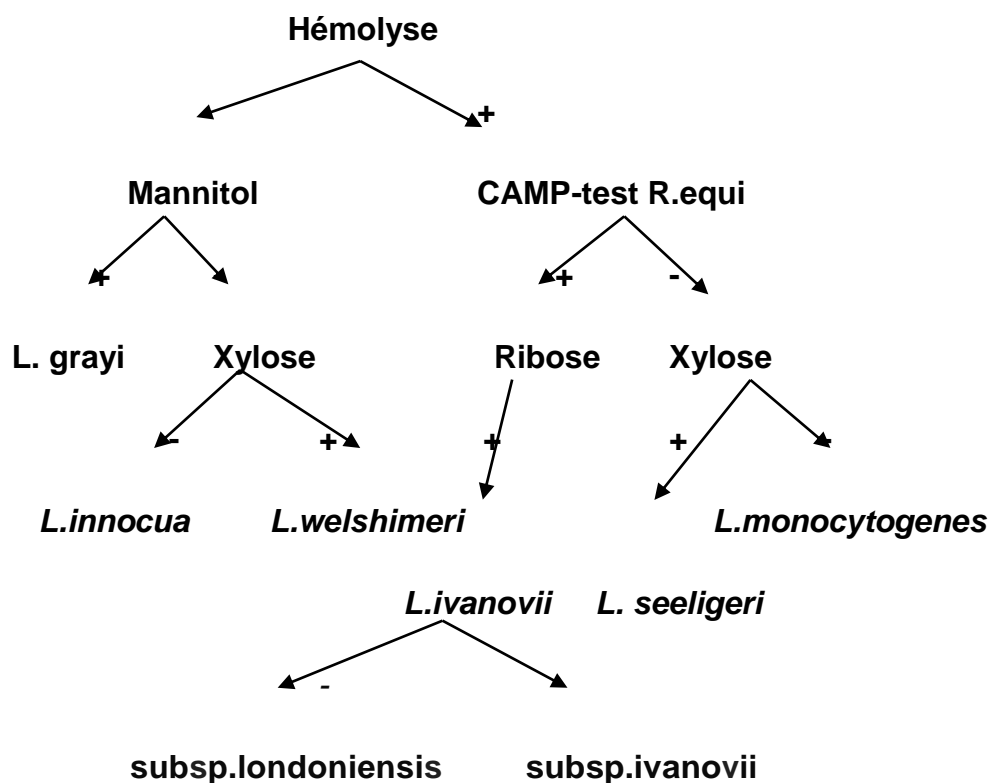


Figure 1.3 : Différenciation des espèces de *Listeria* [38].

### 1.5 Physiologie de *Listeria monocytogenes*

Les *Listeria* sont des bactéries largement répandues dans l'environnement. Elles peuvent être présentes dans le sol, dans des végétaux. Elles sont également isolées dans les égouts et effluents des industries agro-alimentaires. Ce caractère ubiquitaire s'explique par leur résistance importante à certaines conditions environnementales hostiles.

#### 1.5.1- Influence de la Température

La température d'un milieu est un facteur qui conditionne d'une façon particulièrement importante le comportement des germes qu'il héberge.

Chaque espèce de microorganisme a la possibilité de se développer dans une gamme donnée de température caractérisée par une limite inférieure, un optimum et une limite supérieure, au-delà de laquelle la mort survient.

PETRAN et ZOITOLA ont étudié les temps de génération de *Listeria monocytogenes* dans un bouillon trypticase soja, à pH= 7, en fonction de la température du milieu [39].

Tableau 1.5 : Croissance de *Listeria monocytogenes* à différentes températures en bouillon trypticase soja [39].

Température en °C	PH	Temps de génération
4	7	33.5h
7	7	13.1h
10	7	9.6h
13	7	287mn
20	7	113mn
30	7	45.4mn
35	7	42.9mn
37	7	39.8mn
45	7	52.3mn

Les temps de génération les plus faibles ont été obtenus à 30°C, 35°C et 37°C. Cependant les différences obtenues pour ces différentes températures n'étant pas significatives, l'optimum de croissance est donc compris entre 30°C et 37°C.

Des études similaires effectuées dans différents milieux Ryser et Marth, ont permis de déterminer que *Listeria* se développe de +3°C à +45°C [40].

Par ailleurs des réserves sont à émettre quant à la limite inférieure en effet Juntilla chercha à déterminer les températures minimales de croissance de 100 souches de *Listeria*, dont 1/5 appartenait à l'espèce *innocua* non hémolytique. Il trouva que, pour les souches de *Listeria monocytogenes*, la température minimale moyenne était de +1.1 °C (+/-0,3°C) avec un minimum de +0,5°C pour deux souches. La température minimale moyenne pour les souches de *Listeria innocua* étant de +1.7°C (+/- 0,4°C), cette différence de 0,6°C fut par hypothèse attribuée à l'absence d'hémolysine chez cette dernière [41 , 42].

Walker et al. ont montré que certaines souches de *L. monocytogenes* étaient capables de croître jusqu'à -0,4°C si le temps d'incubation est supérieur à 50 jours [43].

Au contraire *L. innocua*, *L. murrayi* et *L. grayi* ne se développent pas respectivement au-dessous de 1,7°C, 2,8°C et 3°C [44].

Toutefois, même si, pour *L. monocytogenes*, un taux de croissance positif est détecté à des températures inférieures à 0°C, celui-ci est extrêmement faible avec des temps de génération allant de 62 à 131 heures, et la croissance n'est observable que pour de longues périodes d'incubation [43].

Le temps de latence et le temps de génération sont rapidement réduits si la température s'élève (tableau 06). Par exemple pour *Listeria monocytogenes* sur du bouillon de poulet, ils diminuent respectivement de 19 heures et 1-2 jours à 9 heures et 1 jour lorsque la température passe de 5 à 7,5°C [44].

En pratique ces résultats soulignent la nécessité d'appliquer une réfrigération précoce, intense et continue aux produits alimentaires pour limiter la croissance des *Listeria*.

Tableau 1.6: Temps de génération de *Listeria monocytogenes* [45].

	Temps de génération en heures				
Température	4°C	8°C	13°C	21°C	35°C
Lait entier	33,27	13,06	5,82	1,86	0,692

Cette vaste gamme de températures de développement ainsi que l'optimum compris entre 30°C et 37°C font de *Listeria* un germe mésophile et psychrotrophe.

De plus, cette fourchette de développement étendue n'implique pas la destruction du germe pour des températures inférieures à + 1 °C, ou supérieures à +45°C.

Des travaux menés par GOLDEN et al. ont en effet montré une résistance du germe aux températures de congélation avec cependant des lésions le rendant plus sensible, notamment à l'égard du NaCl [46].

Les mêmes auteurs ont par ailleurs montré que *Listeria monocytogenes* fait preuve d'une bonne résistance face à l'effet létal de la chaleur jusqu'à une température avoisinant 55°C [46].

#### 1.5.2- Influence de l'acidité [pH]

*L. monocytogenes* peut se développer dans une large gamme de pH allant de 4,3 à 9,6 avec un optimum à pH neutre ou légèrement alcalin [42.47.48]. Ces valeurs de pH dépendent toutefois de la température, de la nature de l'acide et de la nature du milieu [49.50].

*L. monocytogenes* est rapidement détruite au-dessus de pH 10 ou aux pH inférieurs au pH min (pH dépendant de l'acide utilisé, notamment de son pKa, de la température du milieu, et au dessous duquel la mort cellulaire survient après une phase de latence plus ou moins longue). Elle peut par exemple survivre pendant de très longues

périodes à des pH proches de pH 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs [51].

CHEROUTRE-VIALETTE et al ont montré que *L. monocytogenes* surmonte mieux un stress alcalin qu'un stress acide [52].

### 1.5.3- Influence du sel

*L. monocytogenes* ne se développe en général pas dans les solutions contenant plus de 10 % à 11 % de NaCl [53.54].

Toutefois, des souches peuvent survivre à des concentrations de sel plus élevées. Par exemple certaines souches survivent dans des saumures de fromagerie contenant de 13 à 14 % de NaCl [55]. KUKHARKOVA et al ont démontré que *L. monocytogenes* survivait plus de 60 jours dans de la viande stockée à 4°C dans une solution de saumure à 30 % de NaCl qui contenait aussi des nitrates [55.56]. Sielaff a mis en évidence *L. monocytogenes* dans de la viande de bœuf saumurée dans une solution à 22 % de NaCl, après stockage pendant 100 jours entre 15 et 20°C [57].

### 1.5.4- Influence de l'activité de l'eau (a<sub>w</sub>)

Listeria se développe à un optimum d'a<sub>w</sub> de 0,97 mais peut se développer jusqu'à une a<sub>w</sub> de 0,9 [55].

Le germe reste viable, sans multiplication, plusieurs jours pour des a<sub>w</sub> plus faibles par exemple 84 jours à +4°C dans un salami dont l'a<sub>w</sub> est de 0,79-0,86 [58].

## 1.6 Pouvoir pathogène

### 1.6.1 Pouvoir pathogène naturel

#### 1.6.1.1- Entrée de la bactérie dans l'organisme

Les bactéries ingérées avec le bol alimentaire sont largement détruites par l'acidité naturelle de l'estomac. Une fois dans l'intestin, *L. monocytogenes* est capable de franchir la barrière de l'épithélium intestinal de l'hôte infecté probablement directement par invasion entérocytaire [59]. Une fois l'épithélium digestif traversé, les bactéries prolifèrent particulièrement au niveau des plaques de Peyer, où elles

colonisent massivement les cellules dendritiques [60.61]. Ces cellules phagocytaires permettraient à *L. monocytogenes* d'être véhiculée jusqu'aux ganglions mésentériques où elle coloniserait d'autres phagocytes tels les neutrophiles et les monocytes [61.62]. Ces phagocytes circulant permettraient la dissémination de *L. monocytogenes* aux tissus endothéliaux et faciliteraient ainsi l'invasion ultérieure d'organes tels la rate et le foie. *L. monocytogenes* se développe particulièrement dans les hépatocytes et lors d'une seconde phase de dissémination, elle peut gagner le système nerveux.

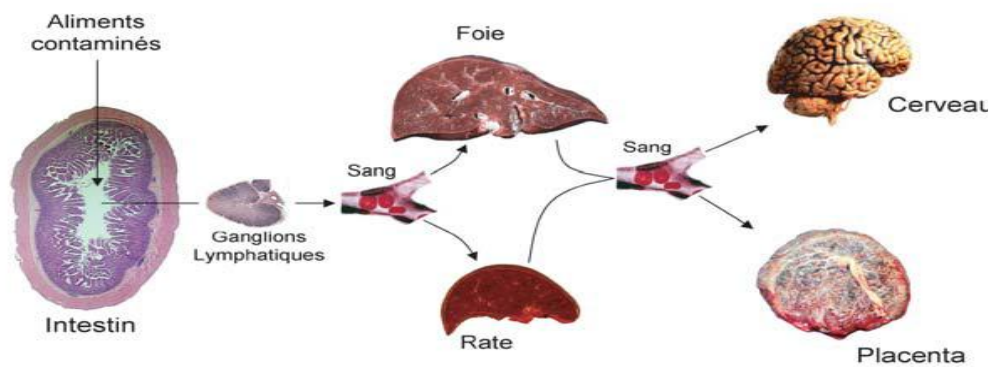


Figure 1.4 : Différentes étapes d'infection cellulaire de *L. monocytogenes* [59].

#### 1.6.1.2- Fixation et pénétration dans les cellules cibles

Les bactéries adhèrent par l'intermédiaire de l'internaline A (InIA), à certaines cellules possédant la E-cadhérine. Ceci induit la phagocytose des bactéries. Une deuxième protéine de surface, l'internaline B (InIB), agit pour favoriser l'entrée dans certaines cellules telles que les hépatocytes avec un mécanisme dit de « fermeture éclair » ou « zipper » [63.64].

#### 1.6.1.3- Multiplication intracellulaire

Dans le phagosome, *L. monocytogenes* est exposée aux mécanismes de défense de l'hôte, tels que l'acidification de la vacuole et la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote [65]. Pour survivre, *L. monocytogenes* s'échappe rapidement de sa vacuole de phagocytose en lysant sa membrane grâce à l'action de deux protéines : la listériolysine O et phosphatidyl-inositol phospholipase C (PI-PLC [66].

La lyse a lieu en une trentaine de minutes. Plusieurs expériences démontrent que *L. monocytogenes* module le trafic intracellulaire et retarde la maturation du phagosome en phagolysosome pour survivre au sein des macrophages [67]. Une fois libres dans le cytoplasme, les bactéries entament une phase de multiplication avec un temps de génération d'environ une heure.

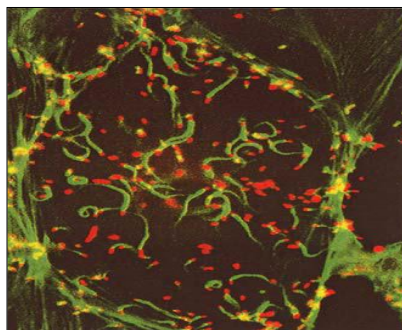
#### 1.6.1.4- Motilité intracellulaire

Une fois libre dans le cytoplasme où elle se divise, *L. monocytogenes* exploite la machinerie cellulaire de l'hôte en recrutant des protéines qui vont être nécessaires à sa motilité. Elle commence à polymériser l'actine cellulaire sous l'action de la protéine bactérienne ActA [68]. Les filaments d'actine cellulaire produits par *L. monocytogenes*, forment des « comètes » qui propulsent la bactérie au sein du cytoplasme. La comète est constituée de filaments d'actines mais aussi d'autres protéines cellulaires nécessaires à la nucléation et à la polymérisation de l'actine. Cet assemblage polaire génère une force suffisante pour propulser la bactérie dans toutes les directions et la rendre motile à l'intérieur du cytoplasme

La vitesse du déplacement, variable selon la nature des cellules infectées, varie de 6 à 90  $\mu\text{m}$  par minute [68].



Figure 1.5 : Comètes d'actine en microscopie électronique [69].



**Figure 1.6** : Comètes d'actine de *L. monocytogenes* (Vert : actine, Rouge : bactéries) [70].

#### 1.6.1.5- Passage de cellule en cellule



Le déplacement de la bactérie à la périphérie cellulaire entraîne la formation d'une protrusion membranaire qui résulte du contact de la bactérie avec la membrane cellulaire. Si la protrusion atteint la membrane plasmique d'une cellule voisine, la bactérie est alors internalisée dans cette nouvelle cellule. *L. monocytogenes* et une partie de sa comète d'actine sont alors entourées d'un double membrane, la membrane de la protrusion et la membrane de la nouvelle vacuole de phagocytose. Un nouveau cycle de vie intracellulaire débute, où *L.monocytogenes* lyse la double membrane de phagocytose, puis prolifère dans le cytoplasme. La lyse de la double membrane est facilitée par l'action de la LLO et de la PC-PLC bactérienne [71].

La capacité de *L. monocytogenes* à se mouvoir intra cellulairement en utilisant l'actine de l'hôte et à lyser les vacuoles de phagocytose, sont deux éléments cruciaux pour la survie intracellulaire de cette bactérie.

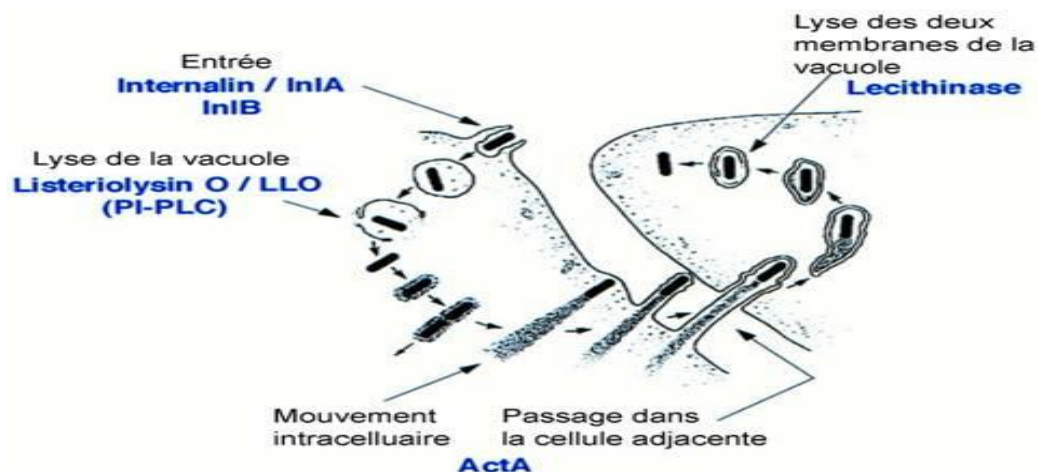


Figure 1.7 : Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection cellulaire de *L. monocytogenes* et des principaux facteurs bactériens associés [72]

## 1.6.2 Pouvoir pathogène expérimentale

### 1.6.2.1 In vivo

L'infection est un processus comportant de nombreuses étapes et de nombreuses variables autant au niveau de l'hôte que de l'agent pathogène. Pour ces raisons, la compréhension de la physiopathologie d'une infection humaine nécessite un modèle animal dans lequel l'agent infectieux a les mêmes effets directs et entraîne des dommages immuno-pathologiques identiques à ceux produit chez l'homme.

Comme la listériose animale existe, les espèces animales naturellement infectées par *L. monocytogenes* peuvent être utilisées comme modèles pour étudier la physiopathologie de la listériose humaine. Cependant, ceci pose un problème car les animaux développant une listériose proche de celle de l'homme sont des animaux de la ferme tels que les moutons ou les vaches, et non pas des animaux de laboratoire tels que des souris ou des rats. Les souris sont généralement de bons modèles de laboratoire car elles sont petites et résistantes, elles s'adaptent bien à la vie en captivité, se reproduisent rapidement, ont des périodes de gestation courtes et une physiologie et une pathophysiologie comparables aux humains. Cependant, certains pathogènes de l'homme n'entraînent pas de maladie chez la souris ou entraînent des symptômes qui peuvent être différents. La souris peut être considérée comme un modèle non satisfaisant pour l'étude de la listériose en raison de la différence au niveau du récepteur d'InIA (la E-cadhérine) qui rend inefficace le passage à travers la barrière intestinale. Aucun cas naturel de listériose chez la souris n'a été rapporté dans la littérature et les essais expérimentaux d'infection par voie orale ont montré que cet animal était difficilement infecté par *L. monocytogenes*. La plupart des études utilisant des souris ou des rats ont montré qu'il était difficile d'induire une infection létale reproductible suite à une infection orale. Pour contourner ce problème, d'autres routes d'infection ont été étudiées bien qu'elles ne correspondent pas à la route naturelle d'infection. Les voies d'infections les plus utilisées sont les voies intraveineuses et intra péritonéales. L'infection de la souris par voie intraveineuse a permis de produire une infection létale et de produire un bon modèle pour étudier les facteurs de virulence impliqués dans la vie intracellulaire de *L. monocytogenes*.

Chez le cobaye et la souris transgénique exprimant la E-cadhérine humaine, les bactéries peuvent traverser efficacement la barrière épithéliale de l'intestin [73]. Ces 2 modèles semblent donc plus appropriés que le modèle murin classique pour l'étude de la listériose transmise par la voie orale.

### 1.6.2.2 Tests in vitro

Le test d'Anton s'effectue sur le lapin ou le cobaye, par instillation d'une goutte d'une suspension de *Listeria* dans le sac conjonctival. En 36-48 heures, une conjonctivite purulente apparait, qui permet d'apprécier le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* ou *Listeria ivanovii*.

Les tests sur cultures cellulaires ont été développés comme alternative moins coûteuse que les tests sur souris. Ces méthodes mesurent la capacité de *L. monocytogenes* à causer des effets cyto-pathogènes sur les lignées cellulaires entérocytiques Caco-2 [74] ou à former des plaques sur les lignées cellulaires humaines d'adénocarcinome HT-29 [75]. De nombreuses autres lignées cellulaires (cellules hépatocytaires Hep-G2, de macrophage J774, épithéliales Henle 407 et L2) ont également été utilisées pour tester la capacité de *L. monocytogenes* à adhérer, envahir, s'échapper des vacuoles, se multiplier à l'intérieur des cellules et se propager aux cellules voisines. L'avantage principal de ces tests in vitro est leur faible coût et leur facilité d'utilisation. Cependant, ces tests prennent beaucoup de temps et connaissent des problèmes de reproductibilité, freinant leur utilisation en laboratoire pour déterminer la virulence et le potentiel pathogène des souches. Il est également possible d'étudier les activités enzymatiques impliquées dans la virulence, c'est-à-dire de rechercher les activités hémolytiques et phospholipasiques (PI-PLC et PCPLC). Sur une gélose contenant 5% de sang de mouton, de cheval, de lapin ou d'homme, les colonies de *L. ivanovii*, *L. monocytogenes* et *L. seeligeri* sont bêta-hémolytiques. L'hémolyse est généralement importante avec *L. ivanovii* (le rayon de la zone d'hémolyse peut atteindre 1 cm après 3 j d'incubation) et les souches peuvent s'entourer de plusieurs zones d'hémolyse. En revanche, l'hémolyse est moins importante pour *L. monocytogenes* ou *L. seeligeri* et elle n'est parfois visible que sous la colonie. L'activité PC-PLC est caractérisée par le développement de zones opaques dues à la dégradation de la lécithine de jaune d'œuf présent dans le milieu de culture. L'activité PI-PLC peut être testée en recouvrant les colonies bactériennes développées sur une gélose nutritive avec un substrat appelé L-ft-phosphatidylinositol. Les colonies possédant une activité PI-PLC présentent un halo trouble autour de la colonie, dû au dégagement de diacyl-glycerol insoluble issu du substrat [75].

### 1.7- Virulence de *L. monocytogenes*

Il est considéré comme facteur de virulence toute molécule bactérienne « facilitant l'invasion d'une cellule hôte et la multiplication bactérienne au sein de l'hôte ». Groisman et ses collaborateurs ont défini les facteurs de virulence d'une bactérie pathogène comme étant des effecteurs bactériens requis pour son pouvoir invasif et/ou toxigène [76]. La plupart des facteurs de virulence de *L. monocytogenes* sont des protéines codées par des gènes dont l'inactivation entraîne une atténuation de la listériose chez l'animal [70,77]. *L. monocytogenes* est une bactérie saprophyte, capable de coloniser différentes variétés de micro-environnements pas forcément propices à sa croissance et où elle est confrontée à différents types de stress. C'est pourquoi elle adopte un cycle de vie adapté aux différents paramètres physico-chimiques qui caractérisent chacun de ces microenvironnements. En effet, elle est capable de survivre en s'adaptant à différents stress comme le lysozyme de la salive, l'acidité de l'estomac, la forte osmolarité et la basse pression en oxygène de l'intestin et des tissus [78]. Au niveau de l'intestin, *L. monocytogenes* entre en compétition avec la flore résidente, notamment pour les nutriments. Elle doit également se protéger contre l'effet délétère des sels biliaires. Au cours de l'infection et à maintes reprises, *L. monocytogenes* rencontre des macrophages et des neutrophiles, et peut être internalisée dans une vacuole de phagocytose. *L. monocytogenes* est alors exposée à l'acidité du phagosome et à la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Ces composés pourraient endommager les protéines, les lipides des membranes et l'ADN de *L. monocytogenes* [79]. De plus, il a été montré que les systèmes qui génèrent les espèces réactives de l'oxygène induisent également un influx de potassium à l'intérieur de la vacuole de phagocytose. Cet influx augmente le pH de la vacuole jusqu'à un pH optimal pour permettre l'activation des protéases. Cette activation pourrait être un mécanisme général de défense contre les bactéries pathogènes [80]. Toutefois, *L. monocytogenes* peut utiliser les nutriments présents dans le cytoplasme de son hôte pour survivre et se répliquer. Le seul transporteur bactérien impliqué dans ce processus, découvert jusqu'à présent, est l'Hpt (Hexose phosphate transporter). Hpt permet à *L. monocytogenes* d'importer et d'utiliser le glucose-1-phosphate intracellulaire, disponible dans le cytoplasme de la cellule [81].

## CHAPITRE 2

### CONTAMINATION DU LAIT CRU PAR LISTERIA

La listériose ne répond pas à la description de l'empoisonnement alimentaire et son origine alimentaire n'est toujours pas facile à démontrer. On rencontre les *Listeria* chez les animaux qui peuvent présenter des signes d'infection (mammites chez les bovins) ou être des porteurs sains. Pourtant, cette maladie peut être fatale, et la nourriture semble bien être la source principale d'infection. Le fait que certaines souches ne soient que faiblement pathogènes ou même non pathogènes empêche une évaluation précise du risque de la listériose [19, 20]. Alors que les résultats d'enquêtes épidémiologiques réalisées au début des années 90 sur l'origine de la contamination du lait de vache par *L. monocytogenes* [82] montrent que la contamination du lait est d'origine environnementale dans près de 95 % des cas. Cette origine se manifeste généralement par une contamination peu fréquente et irrégulière (en moyenne, moins de 2 contrôles positifs / an), avec des concentrations faibles en *L. monocytogenes* (<1 UFC/ml).

Les principales sources de contamination sont la peau des trayons, et plus en amont les fèces et les ensilages de mauvaise qualité, dans lesquels on peut trouver des concentrations de *L. monocytogenes* très élevées (respectivement >10<sup>5</sup>, et >10<sup>7</sup> bactéries/g). Les principaux facteurs de risque associés à la contamination du lait, évalués à partir d'une enquête cas-témoin, sont les ensilages mal confectionnés et mal conservés, de mauvaises conditions d'hygiène dans les étables ou pendant la traite, et les pratiques incorrectes de nettoyage et de désinfection du matériel de traite. Ces résultats suggèrent que le schéma de contamination du lait est le suivant:

- Contamination des fourrages lors de la confection des ensilages, et multiplication en cas de mauvaise conservation,
- Ingestion de fourrage contaminé et excrétion fécale de *Listeria* par les vaches laitières,
- Contamination des litières par les fèces, puis contamination de la peau des trayons,

- Nettoyage insuffisant ou inefficace des mamelles et passage des *Listeria* dans le lait lors de la traite.
- Mauvaises conditions d'hygiène : fréquence insuffisante de nettoyage des aires d'exercice et de renouvellement des litières, hygiène insuffisante de la traite.
- Présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru peut aussi avoir une origine des infections mammaires dues à ce germe. Ces infections sont rares mais peuvent entraîner une contamination massive du lait de troupeau (moins de 10% des élevages étudiés, et 0,2% des animaux prélevés [5, 82].

Dans les fermes laitières, le lait cru peut être contaminé par les fèces. Les études ont confirmés la relation entre la faible qualité de l'ensilage et la présence de *Listeria* dans les fèces. *L. monocytogenes* est l'un des facteurs impliqué dans le développement des mammites bovines. Cependant, les cas de mammites reliés aux infections à *L. monocytogenes* sont rares. Dans le cas de la mammite, le lait contient 2.000 à 20.000 bactéries/ml. Donc, à l'exception des mammites bovines, la procédure de traite représente une source potentielle de contamination du lait cru. Le lait peut être contaminé à partir des pis sales, les tétées, les mains humaines et l'équipement [83].

## **CHAPITRE 3**

### **LISTERIOSE A *L. MONOCYTOGENES***

#### 3.1- Physio-pathologie

Après l'ingestion d'un bol alimentaire contaminé, les bactéries traversent la barrière intestinale, puis elles sont phagocytées par les macrophages résidents de la lamina propria et circulent, libres ou dans des macrophages via la lymphe, vers les ganglions mésentériques.

Elles sont ensuite véhiculées dans les canaux lymphatiques efférents qui se déversent dans la circulation sanguine. Les bactéries se retrouvent alors dans le foie et la rate, principaux organes filtres du système sanguin. Elles sont alors très rapidement ingérées et détruites par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial et en particulier par les macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer [84]. Les bactéries survivantes peuvent se multiplier dans les macrophages et/ou envahir les hépatocytes adjacents qui représentent un site privilégié de multiplication intracellulaire bactérienne.

Au début de l'infection, les hépatocytes infectés sont lysés par les neutrophiles. Les bactéries se retrouvent alors à l'extérieur des cellules et deviennent accessibles à l'ingestion par les macrophages listéricides.

Si la multiplication bactérienne dans ces foyers infectieux n'est pas rapidement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte, les bactéries sont à nouveau disséminées dans le courant sanguin et se dirigent vers le système nerveux et l'unité fœto-placentaire.

Les foyers hépatiques et spléniques peuvent devenir coalescents et atteindre des proportions importantes, en particulier chez le nouveau-né (granulomatis infantiseptica).

#### 3.1.1 Maladie chez l'animal

La contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion des végétaux. Ce sont les herbivores qui sont donc principalement atteints [85.86].

### «3.1.1.1 Clinique

Chez les bovins, la listériose n'est généralement pas très bien connue et un diagnostic étiologique précis n'est pas dénué de difficultés. Elle se présente habituellement et essentiellement sous deux formes cliniques:

#### • **Forme abortive:**

L'utérus paraît être l'organe de loin le plus sensible au point que c'est cette localisation qu'on trouve chaque fois que l'infection s'installe chez un animal gravide. La listériose affecte en premier lieu les enveloppes fœtales et se transmet au veau par voie sanguine, secondairement les liquides amniotiques suite à une élimination bacillaire par voie urinaire [87].

La source habituelle d'infection est l'ensilage et l'avortement se situe le plus souvent entre le quatrième et le septième mois et quelque fois entre le sixième et le huitième mois. La mort du fœtus est de règle ; il peut être emphysémateux ou momifié. Si le veau reste encore vivant au moment de l'avortement, il meurt rapidement. On peut observer un écoulement vaginal purulent chez la mère avant l'expulsion du fœtus. Il y a rétention des enveloppes dans les deux tiers des cas.

La fécondation reste ultérieurement possible et il est rare que la mère avorte une seconde fois.

Dans les quelques cas mortels, la vache sombre dans un état comateux, suite à l'extension de la listériose au cerveau.

L'affection apparaît surtout en hiver avec un maximum en janvier et février, occasionnellement de décembre à avril [5]. Dans 80 % des cas étudiés par Djikstra, les animaux étaient nourris aux ensilages et l'avortement a lieu le plus souvent quatre semaines après l'ouverture du silo, ce qui tend à faire croire que c'est là, la durée de l'incubation de l'infection.

- **Forme nerveuse : méningo-encéphalite** : C'est la forme habituelle de listériose des bovins non gravides, et sans doute, aujourd'hui la cause la plus fréquente d'encéphalite dans cette espèce. L'infection cérébrale est généralement localisée aux régions de la base, aux pédoncules cérébraux et au cervelet. Les lésions ne sont pas abondantes, il n'y a pas d'atteinte des cellules nerveuses et les bacilles sont peu nombreux.

On trouve à l'endroit de l'infection, une réaction à dominance lymphocytaire, sans caractère pyogène et sans grosse réaction vasculo-sanguine. Ceci est essentiel



pour comprendre le succès thérapeutique. Du point de vue symptomatologie, il existe une entité clinique caractéristique qui, à elle seule, tient lieu de diagnostic. Il s'agit de l'encéphalite qui s'accompagne d'une atteinte du nerf facial trijumeau [88]. Les principaux symptômes associés à l'encéphalite bovine à *Listeria* ont été rapportés par DIJKSTRA [88].

- Tremblements musculaires
- Tournis à gauche
- Tournis à droit
- Ataxie
- Mouvements impulsifs
- Impossibilité de déglutition
- Salivation
- Paralyse de la langue
- Paralyse faciale unilatérale
- Paralyse faciale bilatérale
- Larmoiements
- Phénomènes d'excitation
- Cécité
- Somnolence
- Paralyse des membres

Le délai d'incubation de l'encéphalite paraît plus long que celui de l'avortement. En conséquence, les accidents d'encéphalite se situent plus tard dans l'année que les avortements, donc après des périodes d'avortements et le vétérinaire clinicien doit garder un œil attentif pendant longtemps.

On peut aussi observer des formes septicémiques chez le jeune veau ou des mammites à *Listeria* chez la vache, mais celles-ci sont proportionnellement plus rares.

Les principales manifestations cliniques de la listériose chez les différentes espèces animales figurent dans le tableau ci-après.

### Tableau 3.1 : Manifestations cliniques de la listériose chez les espèces [51]

#### 3.1.1.2- Epidémiologie

En élevage intensif, chez les animaux nourris avec des ensilages, les listérioses se présentent le plus souvent sous forme de cas sporadiques et quelques fois même endémiques.

Chez les bovins, les formes abortives sont plus fréquentes; par contre, les formes méningo-encéphalitiques sont plus fréquentes chez les ovins et les caprins [87].

En fonction des techniques d'élevage, la maladie évolue le plus souvent en hiver et au printemps chez les bovins laitiers. Il en est de même, pour tous les herbivores qui reçoivent en hiver et au printemps des ensilages ou des foin mal conservés. Toutefois, l'affection peut évoluer également toute l'année chez les animaux en stabulation qui reçoivent des ensilages, des pulpes ou des tourteaux en continu.

#### 3.1.1.2- Diagnostic

##### a)- Diagnostic bactériologique

Le diagnostic est fait à partir de prélèvements effectués sur les animaux : avortons, placenta, système nerveux central (encéphale, cervelet, bulbe), cœur et sang du cœur, foie, rate, peau éventuellement. L'ensemencement se fait sur milieux adéquats après broyage des échantillons prélevés [51].

##### b)- Diagnostic sérologique

La détection des anticorps anti *Listeria* est peu spécifique, elle peut avoir une utilité purement indicative si elle est effectuée sur plusieurs sérums d'animaux d'une exploitation à surveiller, mais l'isolement du germe reste la méthode de certitude [51].

#### 3.1.1.3- Traitement

En pratique, on utilise l'association ampicilline-gentamicine, ou spiramycine-métronidazole ou ampicilline-colistine, ou les tétracyclines pendant 7 à 10 jours au moins, en fonction des formes médicamenteuses. On associe au traitement antibiotique un complexe vitaminique B en intra veineuse, pendant 3 jours [89.90].

Espèces	Manifestations cliniques	Fréquence
Bovins, Ovins, Caprins	Formes abortives Formes nerveuses Formes septicémiques Formes oculaires : (conjonctivite, kératite, uvéite) Formes mammaires Formes digestives	Les plus fréquentes Néonatale le plus souvent Peuvent être associés ou non à d'autres affections Plus rares, portage le + souvent décrit mais pas systématique
Equins	Plus rares mais décrites Formes nerveuses Formes abortives Formes septicémiques Formes oculaires Formes digestives	Existents mais très rares 1 % des avortements décrits chez le poulain
Porcins	Rares mais décrites Formes nerveuses Souvent porteurs sains	Chez les jeunes animaux mais peuvent guérir spontanément
Carnivores	Très rares Formes nerveuses Formes septicémiques Formes cutanées Animaux porteurs sains	Chez les jeunes animaux, associés à d'autres affections. Très rares mais décrites
Lagomorphes	Formes abortives Formes nerveuses Formes septicémiques Formes mammaires Formes respiratoires Formes cutanées Formes conjonctivales	Fait suite aux deux précédentes, néonatale le plus souvent sur tous les petits d'une portée.
Rongeurs	Formes septicémiques Formes conjonctivales et respiratoires Porteurs sains importants	Le plus souvent maladie endémique dans les élevages ou les colonies d'animaux sauvages
Oiseaux	Formes septicémiques le plus souvent Formes digestives Formes nerveuses et/ou septicémiques	Cas sporadiques en élevage, mais certaines exploitations peuvent être touchées jusqu'à 40% de mortalité et plus : enzootie

En cas d'avortement, on peut utiliser de l'amoxicilline localement par voie intra-utérine et par voie générale [51].

Il faut prendre en considération également la capacité de *Listeria* à passer

Poissons	Formes septicémiques Formes cutanées	Cas sporadiques en pisciculture d'étangs pouvant être associés ou non à d'autres pathologies et entraîner une forte mortalité Associées ou non aux formes septicémiques
Batraciens	Porteurs sains	/
Reptiles	Porteurs sains	/

directement d'une cellule à l'autre et de se disséminer ainsi à l'intérieur des tissus ; ceci est alors une autre stratégie très importante.

### 3.1.2- Maladie chez l'homme

*L. monocytogenes* est la seule espèce du genre *Listeria* à être considérée comme pathogène chez l'homme. Cependant, bien que *L. ivanovii* est considérée comme non pathogène pour l'homme, il est à noter que 8 cas de listériose dus à cette espèce ont été rapportés.

Les infections à *L. monocytogenes* s'observent, essentiellement chez les femmes Enceintes (quel que soit le terme de la grossesse), les nouveau-nés contaminés par leurs mères et les individus présentant des troubles du système immunitaire dus à diverses causes (personnes atteintes d'hémopathies, transplantées, atteintes de SIDA, personnes atteintes de cancers solides, d'hépatopathies et les hémodialysés, personnes diabétiques mal équilibrées et les alcooliques.)

#### 3.1.2.1. Formes cliniques

##### 3.1.2.1.1. Listériose materno-néonatale

Selon le moment et la voie d'infection les manifestations cliniques sont variables.

##### 3.1.2.1.2. Listériose de la femme enceinte

La contamination de la mère se fait par voie orale. Chez la femme enceinte, la listériose se traduit par un épisode fébrile, le plus souvent spontanément résolutif en quelques jours. Elle peut même passer inaperçue pour la mère. Cependant elle

peut entraîner la contamination du fœtus ou de l'enfant lors de l'accouchement. [44.51].

#### 3.1.2.1.3. Listériose néonatale précoce

Cette forme représente plus de 90% des cas de listériose néonatale.

*L. monocytogenes* infecte l'enfant par voie hématogène trans-placentaire à la suite d'une bactériémie de la mère, entraînant mort in utero, avortement, fausse-couche ou accouchement prématuré selon le stade de la grossesse. La majorité des cas diagnostiqués survient après le 5<sup>ème</sup> mois. Lorsque l'infection se déclare antérieurement elle provoque des avortements spontanés.

L'infection du nouveau-né se révèle très rapidement, autour de 1 ou 2 jours post-partum. Elle se présente sous une forme septicémique qui prend le plus souvent l'allure d'une souffrance néonatale : détresse respiratoire et/ou cardiaque, hypotonicité, fièvre ou hypothermie, accompagnée parfois d'«hépatosplénomégalie». Dans une forme évoluée, elle prend la forme de la granulomatosose septique infantile (*Granulomatosa infantiseptica*) avec des granulomes bactériens disséminés, atteignant la plupart des organes et s'accompagnant d'un purpura ou d'éruption cutanée maculo-papuleuse ou maculo-pustuleuse. L'anémie et la thrombopénie sont fréquentes. L'atteinte méningée accompagne très rarement ce tableau d'infection généralisée.

Dans ces formes graves, l'évolution est le plus souvent mortelle en quelques jours dans 50 à 75% des cas.

L'enfant peut aussi naître sain, mais les prélèvements gastriques ou de méconium peuvent révéler *L. monocytogenes*. Dans ce cas un traitement s'impose. [44.51]

#### 3.1.2.1.4. Listériose néonatale tardive

Cette forme de listériose aurait pour origine une contamination du fœtus par le liquide amniotique ou encore au cours du passage dans la filière génitale lors de l'accouchement. Elle se manifeste tardivement, en moyenne 2 semaines après la

naissance majoritairement sous forme d'une méningite convulsion, détresse respiratoire voire coma.

Cette forme est rare, moins de 10 % des listérioses néonatales [6].

Le diagnostic est habituellement rapidement établi, expliquant la faible mortalité dans cette forme clinique. Cependant malgré le traitement des séquelles sont possibles.

#### 3.1.2.1.5. Listérioses de l'enfant et de l'adulte

S'il est vrai que la maladie revêt une fréquence et une gravité particulière chez l'immunodéprimé, le vieillard et le nouveau-né, il demeure que cet agent peut également frapper des individus en parfaite santé [91].

On distingue ici aussi plusieurs formes cliniques.

#### 3.1.2.1.6. Listérioses invasives

Il s'agit principalement de formes nerveuses : méningite ou encéphalite, les deux pouvant être associées.

L'atteinte des méninges détermine l'apparition d'un syndrome qui ne diffère en rien de celui des autres méningites bactériennes : hyperthermie sévère, raideur de la nuque, nausées, vomissements.

Lorsque l'encéphale est atteint, des troubles nerveux apparaissent : paralysie des nerfs crâniens (paralysie oculomotrice, faciale), hémiplégie. Les complications sont essentiellement respiratoires.

Chez les sujets immunodéprimés des formes septicémiques sont rencontrées. Elles se manifestent sous forme d'un épisode fébrile éventuellement associé à une atteinte de l'état général : fatigue, douleurs abdominales, vomissements. Elles peuvent se compliquer par des atteintes locales : pneumonie, endocardite, abcès hépatiques [44, 51].

#### 3.1.2.1.7. Listérioses non invasives

Certains cas de listérioses localisées peuvent survenir en dehors de toute atteinte systémique : des formes cutanées que l'on retrouve dans des professions à risque (chez les éleveurs, les vétérinaires ou les bouchers) ou encore des conjonctivites

[44, 51].

#### 3.1.2.1.8. Portage asymptomatique

Etant donné la faible incidence de la listériose, on peut également se demander s'il existe un portage de *L. monocytogenes* ne provoquant pas de maladie. Les publications sur ce sujet montrent une faible fréquence de portage asymptomatique, puisque *L. monocytogenes* a été trouvé dans 0.12% à 4.7% des échantillons fécaux prélevés sur des adultes en bonne santé [92]. Cependant, cette fréquence est élevée par rapport au nombre de cas de listériose, puisque seulement 0.00034% de la population est touchée par la listériose chaque année.

La faible fréquence de portage fécal de *L. monocytogenes* pourrait s'expliquer par un effet protecteur de l'acide gastrique contre le passage d'organismes pathogènes. En effet, Cobb a montré une importante augmentation de la fréquence de *L. monocytogenes* (20% de portage) chez les patients recevant un traitement supprimeur de l'acide gastrique. Cependant, aucun de ces patients n'a développé de listériose. La plupart des souches isolées de ces échantillons fécaux appartenaient aux mêmes sérovars que ceux principalement retrouvés dans les cas de listériose, c'est-à-dire les sérovars 1/2a, 1/2b et 4b [91].

Des études qui ont été fait sur trois volontaires adultes en bonne santé pendant un an. En moyenne, deux épisodes de portage de *L. monocytogenes* ont été observés par personne et le portage fécal ne durait pas plus de 4 jours.

#### 3.1.3. Epidémiologie

*L. monocytogenes* est à l'origine d'une maladie grave, la listériose. La plupart des pandémies de listériose ont été observées en Europe et en Amérique du nord. Cette infection est rare comparée aux autres maladies transmises par les aliments, puisqu'elle a une incidence de 2 à 10 cas par million d'habitants par an. Cependant, cette maladie entraîne une hospitalisation quasi systématique et un nombre élevé de décès. En effet, environ 25-30% des personnes atteintes de listériose décèdent, ce qui en fait une des plus fréquente cause de décès dû à une contamination alimentaire. Pour cette catégorie de maladie, elle est la deuxième cause de mortalité juste après la salmonellose en France [93], et aux Etats- Unis (28% des décès dus à une infection alimentaire [94]. Malgré les efforts des industriels de la filière alimentaire et la mise en place d'un système de surveillance efficace en France qui a permis de

diminuer les cas de listériose humaine, le risque sanitaire reste donc important. De plus, alors que les cas de listériose ont diminués en France ces dernières années, il est important de noter que cette maladie a progressé dans certains pays comme l'Allemagne avec 510 cas de listérioses recensés en 2005 contre seulement 217 en 2001.

### 3.1.3. Diagnostic

#### 3.1.3.1- Diagnostic direct

Le diagnostic est essentiellement fondé sur l'isolement bactériologique de *L. monocytogenes* du sang ou du LCR. L'hémoculture est souvent le seul moyen pour diagnostiquer une encéphalite à *L. monocytogenes*, le LCR ne se positivant que lorsque l'infection diffuse aux méninges (et donc tardivement). Du fait de l'ubiquité de *L. monocytogenes* et d'un portage de 5 % de la population, les prélèvements périphériques, de muqueuse ou de selles ont très peu ou pas de valeur (en dehors de suppurations manifestes qui s'accompagnent d'une visualisation à l'examen direct).

Dans le cas de l'infection du nouveau-né ou du fœtus, *L. monocytogenes* est isolé sur l'enfant (prélèvement gastrique, méconium), il peut être recherché dans le placenta [51].

#### 3.1.3.2 - Diagnostic indirect

La détection des anticorps anti-Listeria n'a que peu d'intérêt si le germe est isolé en culture : le diagnostic bactériologique doit être privilégié pour la surveillance et la détection des épidémies. Les tests sérologiques peuvent être un appoint au diagnostic en cas de suspicion de listériose sans germe isolé en culture.

##### 3.1.3.2.1. Anticorps anti-listériolysine O

La recherche d'anticorps contre un facteur de virulence a l'intérêt d'utiliser un antigène très spécifique du pathogène, la listériolysine O (LLO). Ce test utilise la méthode du Western-Blot. Il est important de réaliser au moins deux tests à 15 jours d'intervalle. Chez les patients présentant une infection aiguë, les titres oscillent entre 1/100 à 1/400 dans le premier prélèvement, et peuvent atteindre chez certains patients 1/1600 voire plus (1/5000) dans le 2ème prélèvement. Les titres élevés sont



très en faveur d'une exposition importante à *L. monocytogenes* ayant donné lieu à un processus invasif. L'absence d'anticorps anti-LLO n'élimine pas formellement le diagnostic chez les sujets fortement immunodéprimés [95].

#### 3.1.3.2.2. Anticorps dirigés contre la bactérie

De nombreux tests sérologiques de ce type (agglutination, fixation du complément, hémagglutination directe ou indirecte) ont été décrits. Ils sont, dans l'ensemble, peu sensibles, peu spécifiques et difficilement comparables entre eux et posent donc des problèmes d'interprétation. Ils ne sont pas recommandés [95].

#### 3.1.4. Immunité

La résistance naturelle contre *L. monocytogenes* implique le recrutement et l'activation des cellules phagocytaires aux sites de l'infection. Un afflux massif de polynucléaires neutrophiles est précocement observé. Les cellules détruisent les hépatocytes infectés, libérant les bactéries qui sont alors rapidement détruites par ces cellules phagocytaires. Ce mécanisme de résistance semble parmi les plus efficaces mis en jeu lors de la primo-infection. Conjointement, les macrophages infectés par les bactéries produisent du TNF- $\alpha$ , (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) et de l'IL-12. Ces cytokines, en association avec des facteurs bactériens, activent les cellules NK (natural killer), qui produisent l'interféron. Cette cytokine en synergie avec TNF- $\alpha$ , active à son tour les activités bactéricides des macrophages [96].

La résistance acquise spécifique fait suite à cette première vague de défenses non spécifiques. Cette résistance est liée à l'expansion clonale de cellules T dirigées contre des déterminants antigéniques de *L. monocytogenes*, et requiert la multiplication active des bactéries dans les cellules présentatrices. Les cellules CD4- $\alpha\beta$  et les cellules T-g $\delta$  sont surtout impliquées dans la formation des granulomes inflammatoires qui caractérisent les lésions tissulaires observées au cours de l'infection par *L. monocytogenes*, mais ces cellules ne sont pas directement impliquées dans la protection. En revanche, les cellules T-CD8- $\alpha\beta$  jouent un rôle important dans la protection par leur effet cytotoxique, exposant ainsi les bactéries intracellulaires aux polynucléaires neutrophiles et aux macrophages [97]. Ces cellules cytotoxiques reconnaissent des peptides associés aux molécules de classe I du système majeur d'histocompatibilité, notamment ceux provenant de la listériolysine O. Les cellules CD8 anti-listériolysine O, plus spécifiquement dirigées

contre l'épitope 91-90, sont protectrices. La listériolysine O est un antigène protecteur. Les anticorps anti-listériolysine O sont retrouvés au cours de l'infection humaine et animale et pourraient contribuer à l'immunité protectrice [98].

### 3.1.5 - Prévention

Les *Listeria* étant présentes dans notre environnement, il n'est pas possible de les éliminer. Il faut en revanche s'efforcer de réduire au maximum la contamination de la production laitière par une hygiène rigoureuse à tous les niveaux. Lorsqu'on réduit le risque contamination par *Listeria*, on diminue également le nombre de butyriques, les comptages de germes totaux, et le risque de contamination par d'autres agents pathogènes comme : *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*

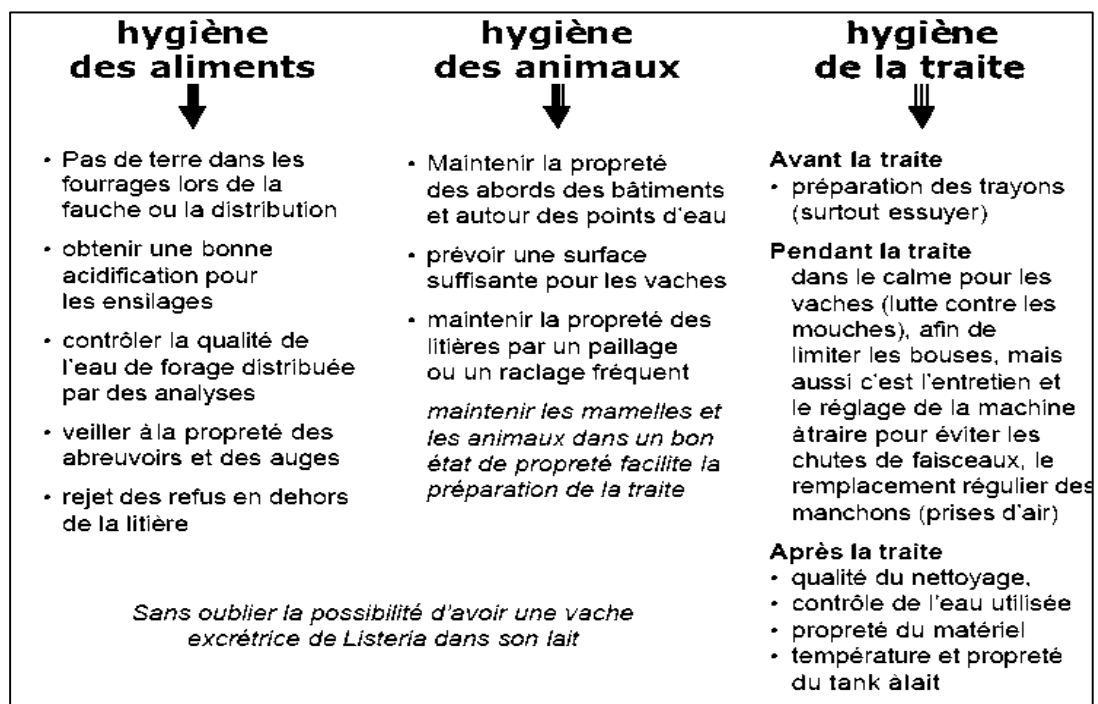


Figure 3.1 : Prévention des contaminations par *Listeria spp.*

Lorsqu'on est en présence de fourrages contaminés, le mieux est d'arrêter la distribution de l'aliment en cause aux vaches laitières mais racheter une récolte est souvent difficile et c'est pourquoi il vaut mieux s'efforcer d'agir en amont [99].

**Précaution à prendre pour la prévention de la listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées : [100].**

**Aliments à éviter :**

- Eviter la consommation de fromages à pâte molle **au lait cru**  
Enlever la croûte des fromages avant consommation  
Eviter la consommation de fromages vendus râpés ;
- Eviter la consommation de poissons **fumés** ;
- Eviter la consommation de graines germées crues.
- Eviter la consommation de produits de charcuterie cuite **consommés en l'état**  
ex : pâté, rillettes, produits en gelée, jambon cuit ; Si achetés, préférer les produits préemballés et les consommer rapidement après leur achat.
- Eviter la consommation de produits de charcuterie **crue** consommés en l'état  
- Les faire cuire avant consommation, ex : lardons, bacon, jambon cru
- Eviter la consommation de produits achetés au rayon traiteur ;
- Eviter la consommation de coquillages crus, surimi, tarama.

#### **Règles d'hygiène à respecter :**

- Cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale (viandes, poissons)  
; en particulier le steak haché doit être cuit à cœur ;
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques ;
- Conserver les aliments crus (viande, légumes) séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés ;
- Après la manipulation d'aliments non cuits se laver les mains et nettoyer les ustensiles de cuisine qui ont été en contact avec ces aliments ;
- Nettoyer fréquemment et désinfecter avec de l'eau javellisée le réfrigérateur
- Les restes alimentaires et les plats cuisinés doivent être réchauffés soigneusement avant consommation immédiate.

## CHAPITRE 4

### METHODES DE RECHERCHE DE *L. MONOCYTOGENES*

La première méthode bactériologique proposée, repose sur le caractère psychrophile des *Listeria* et suppose donc, un enrichissement sélectif de trois à quatre semaines à + 4°C. Cette étape a été jugée très longue, car elle ne répond pas aux exigences des délais de réponse, déjà posés. Depuis, beaucoup de progrès ont été réalisés de façon à optimiser la sélectivité de la culture et le temps nécessaire à la détection de *Listeria monocytogenes* est passé de trois à quatre semaines à 7 voire 4 jours. De plus, la connaissance de la résistance de *Listeria* à de nombreux inhibiteurs a permis d'évoluer vers des techniques d'enrichissement plus rapides de l'ordre de 2 à 3 jours à 30 et/ou 37°C.

Par contre, il faut signaler que la recherche de *Listeria* est relativement simple lorsque celle-ci est abondante dans le prélèvement à analyser. Or, dans la majorité des cas, le problème ne se pose pas de la même façon. Les *Listeria* sont en général en petit nombre et elles sont accompagnées d'une flore associée abondante : c'est le cas des laits crus.

#### 4.1- Méthode de routine AFNOR NF V 08 055

L'échantillon est placé dans un bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10. Le bouillon est ensuite incubé à 30 °C durant 18 à 24 heures. Après incubation, le bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" est repiqué sur gélose PALCAM ou OXFORD et 0,1 ml de ce bouillon est mis en culture dans 10 ml de bouillon d'enrichissement de Fraser qui sera incubé durant 36 à 48 heures à 37 °C. Le bouillon d'enrichissement de Fraser est repiqué après 18 ou 24 heures d'incubation et après 36 ou 48 heures d'incubation sur gélose PALCAM ou OXFORD. Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies suspectes sont repiquées sur des géloses non sélectives comme les géloses trypticase soja aux extraits de levure (incubées durant 18-24 heures à 37 °C) puis identifiées.

Sur gélose OXFORD, les colonies de *Listeria* apparaissent noires et entourées d'un halo noir [101].

#### 4.2- Méthode normalisée NF EN ISO 11290-1

La méthode internationale normalisée NF EN ISO 11290-1 est voisine de la précédente. La principale différence est qu'elle préconise un isolement sur géloses PALCAM et OXFORD au lieu d'un repiquage sur géloses PALCAM ou OXFORD. Vingt cinq grammes d'échantillon sont placés dans 225 ml de bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" et broyés au Stomacher. Le bouillon est incubé 24 heures à 30 °C puis isolé sur géloses PALCAM et Oxford. Un aliquote (0,1 ml) du bouillon Fraser "demi" est ensemencé dans 10 ml de bouillon d'enrichissement Fraser incubé 48 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation le bouillon d'enrichissement Fraser est isolé sur géloses PALCAM et OXFORD. Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies suspectes sont repiquées sur des géloses non sélectives comme les géloses trypticase soja aux extraits de levure (incubées durant 18-24 heures à 37 °C) puis identifiées. Certaines souches de *L. monocytogenes* peuvent être altérées par des traitements technologiques appliqués en agroalimentaires et qui deviennent sensibles à certains inhibiteurs utilisés dans les milieux de cultures sélectifs. Ces souches peuvent, dans ces conditions, parfois ne plus cultiver sur gélose PALCAM mais continuer à le faire sur gélose OXFORD moins inhibitrice mais moins sélective et laissant cultiver des micro-organismes susceptibles de masquer la présence de *Listeria*. C'est pourquoi la méthode normalisée NF EN ISO 11290-1 demande d'effectuer l'isolement sur les deux milieux gélosés OXFORD et PALCAM. L'état physiologique des bactéries recherchées conditionne largement le succès ou l'échec de la détection ou l'exactitude du dénombrement [101]

##### 4.2.1- Méthode "Rapid'L Mono"

Validée par l'Association Française de Normalisation (AFNOR), cette technique utilise un milieu gélosé sélectif permettant une identification en 24-48 heures après l'étape de pré-enrichissement.

Le milieu *Rapid'L Mono* permet la détection chromogénique d'une phospholipase C produite par *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* et une différenciation de ces deux

espèces basées sur la capacité d'acidification du Xylose. 25 grammes d'échantillon sont placés dans 225 ml de bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" et broyés au Stomacher. Le bouillon est incubé 24 heures à 30°C puis isolé sur gélose Rapid'L.Mono. Un aliquote (0,1 ml) du bouillon Fraser "demi" est ensemencé dans 10 ml de bouillon d'enrichissement Fraser incubé 48 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation le bouillon d'enrichissement Fraser est isolé sur gélose Rapid'L.Mono. Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies de *L. monocytogenes* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) sans halo jaune (absence d'acidification du xylose). Les colonies de *L. ivanovii* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) entourées d'un halo jaune (acidification du xylose). Les colonies des autres espèces sont blanches (absence de synthèse de phospholipase C), entourées d'un halo jaune (*Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*) ou dépourvues d'un halo jaune (*Listeria grayi*, *Listeria innocua*) [101].

#### 4.2.2- Méthode LISTERSCREEN

Validée par AFNOR en 1995, le Listerscreen est une méthode de détection des *Listeria* dont le principe est basé premièrement sur une période d'enrichissement en bouillon Fraser "demi" suivie d'une deuxième étape qui repose sur l'immuno-capture des *Listeria* réalisés par l'intermédiaire d'anticorps polyclonaux fixés sur billes magnétiques microscopiques. Cette étape permet de sélectionner et de concentrer les *Listeria* qui sont ensuite étalées sur une gélose sélective PALCAM [101].

#### 4.2.3- Méthode Polymérase Chain Réaction (PCR)

La Polymérase Chain Réaction (PCR) est une technique de biologie moléculaire mise au point en 1985 par MULLIS K. C'est une technique d'amplification génique qui met en évidence un gène (ou portion de gènes) spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une souche d'un organisme ; des oligonucléotides amorces judicieusement choisis vont permettre l'amplification du fragment délimité par les amorces à l'aide d'une polymérase thermorésistante ; après de multiples cycles, le fragment amplifié est mis en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose [102].

L'introduction des kits commercialisés utilisant la PCR a facilité l'utilisation en routine de cette méthode. Le principe est identique quelle que soit la méthode. Il repose sur l'amplification par PCR d'une séquence nucléique spécifique de *L.*

*monocytogenes*. Les séquences amplifiées sont variables, elles sont souvent dérivées des gènes de virulence spécifiques à *L. monocytogenes* telle celle de la listériolysine, de la protéine d'invasion, de la phospholipase C. D'autres séquences spécifiques de *L. monocytogenes* peuvent servir de cible pour la PCR.

#### 4.2.4- Méthode VIDAS® LDUO

Le nouveau test VIDAS® LDUO de bio Mérieux permet aujourd'hui la détection simultanée et différenciée dans un seul test de *L. monocytogenes* et *Listeria spp* pour les produits alimentaires et les échantillons d'environnement. Développé à partir du savoir-faire de bio Mérieux dans les immuno-essais, le test utilise des anticorps spécifiques prétraités qui améliorent encore ses performances, en termes de sensibilité et de spécificité. Le test VIDAS® LDUO, combiné avec le bouillon d'enrichissement LX, permet une croissance plus rapide des bactéries et une meilleure détection, donnant ainsi des résultats supérieurs à la méthode ISO 11290-1. VIDAS® LDUO : Validé ISO 16140 par l'AFNOR VIDAS®, le premier système mondial pour la recherche automatisée des pathogènes dans l'agroalimentaire, vient d'obtenir la validation par l'AFNOR selon la norme ISO 16140 (BIO-12/18-03/06) de son dernier test, particulièrement innovant pour la maîtrise du risque Listeria: VIDAS® Listeria DUO. Il s'agit de la trentième validation de VIDAS® [101].

#### 4.2.5- Tests d'identification rapide

Des tests commerciaux permettent une détection rapide des Listeria présentes dans les denrées alimentaires après enrichissement sélectif. Certains de ces tests ont été validés par L'AFNOR. Ils reposent soit sur des techniques immuno-enzymatiques utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques du genre Listeria (kit Transia®, Vidas Listeria sp. ®...) ou spécifiques de *L. monocytogenes* (Vidas *L. monocytogenes*®, Lister test®...) soit sur des techniques faisant appel à des sondes spécifiques de *L. monocytogenes* et à des tests PCR (Genetrack *L. monocytogenes*®, Accuprobe *L. monocytogenes*®, Probelia *L. monocytogenes*®...). Ces différents tests ne sont pas destinés à un diagnostic clinique effectué à partir de prélèvements d'origine humaine ou animale. Une sonde chimio-luminescente, commercialisée par Gen-Probe, permet de confirmer, en 30 minutes, qu'une colonie isolée sur un milieu gélosé est bien une colonie de *L. monocytogenes* [101].

#### 4.2.6- Sous-typage de *L. monocytogenes*

Différentes méthodes sont aujourd'hui disponibles pour différencier les souches de *L. monocytogenes*. Certaines sont anciennes mais encore très largement utilisées comme la Sérotypie et la Lysotypie. Les méthodes plus récentes reposent sur la caractérisation du génome et s'appliquent à de nombreuses espèces bactériennes ; elles ont été particulièrement bien développées et rapidement appliquées à *L. monocytogenes* en raison de l'importance du problème épidémiologique posé par la listériose.

##### 4.2.6.1- Sérotypie

La Sérotypie est une technique qui permet la caractérisation de différentes souches en fonction de leur composition antigénique. Des solutions, dans lesquelles sont solubilisés des anticorps, sont placées en présence des souches bactériennes à l'étude. Dans le genre *Listeria*, 15 antigènes somatiques (I à XV) et cinq antigènes flagellaires (A à E) peuvent être distingués (Annexe I). La combinaison de ces facteurs permet de différencier 17 sérotypes dans le genre, dont 12 associés à l'espèce *L. monocytogenes*. À la suite de réactions positives d'agglutination anticorps-antigène, le sérotype peut alors être déterminé [103,104, 105, 106]. Sept des sérotypes connus de *L. monocytogenes* [106, 107] ont été répartis en trois lignées génétiques (I, II, III) (Tableau 4.1).

**Tableau 4.1** : Sérotypes associés aux lignées génétiques de *L. monocytogenes* et nombre de cas relatifs.

Lignée	Sérotypes	Cas humains		Cas animaux (%)
		Invasifs (%)	Bénins (%)	
I	1/2b, 3c, 4b	92,9	62,9	42,1
II	1/2a, 3a	7,1	36,2	47,4
III	4a, 4c	0	1,0	10,5

Adapté de BERGHOLZ et JEFFERS [108, 109]

Les souches appartenant à la **lignée I** sont majoritairement associées aux cas de listériose humaine (Tableau 07), particulièrement celles associées aux sérotypes 1/2b et 4b [106.108.109] Les souches de la **lignée II** sont principalement isolées d'aliments ou de l'environnement [108]. Le sérotype 1/2a est celui le plus fréquemment isolé dans un environnement de transformation alimentaire [110] et a



été prédominant dans les cas de listériose humaine [111]. Finalement, les souches de la **lignée III** sont plutôt associées à la listériose animale.

Cependant, l'information contenue dans l'article de BERGHOLZ et al. (2010) [108] semble incomplète puisqu'ils ne font état que de sept sérotypes (Tableau 08) alors que la charte de sérotypage de *L. monocytogenes* distingue maintenant 12 sérotypes pour *L. monocytogenes*, dont 1/2c, 3b, 4ab, 4d et 4e

#### 4.2.6.2- Lysotypage

La Lysotypie, développée pour pallier les insuffisances du sérotypage, est également une méthode réservée aux laboratoires spécialisés. En 1981, un atelier de travail international a permis de sélectionner 29 phages (appartenant aux familles des Myoviridae et des Styloviridae) isolés de souches de *Listeria* spp ou du milieu extérieur. De nombreuses souches, notamment des souches présentes dans les aliments ou dans le milieu extérieur, sont non typables mais, 93 % des souches du sérovar 1/2 et 99 % des souches du sérogroupe 4 se sont avérées typables dans une étude effectuée par LOESSNER. La Lysotypie est très utile pour les enquêtes épidémiologiques et depuis 1991, la procédure dite "reverse" a simplifié la mise en oeuvre de cette technique. Dans la procédure "reverse", les suspensions de phages sont déposées sur une gélose tryptose qui est mise à sécher puisensemencée avec une culture en phase exponentielle de la souche à typer. La lecture est effectuée après 12 heures et 36 heures d'incubation. Les boîtes de gélose sur lesquelles sont absorbées les phages peuvent être préparées à l'avance et elles se conservent 6 semaines à +4°C ce qui facilite la réalisation de la technique et permet de gagner beaucoup de temps [112.113].

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce travail bibliographique s'articule autour de quatre chapitres. Il débute tout logiquement par la présentation et l'étude bactériologique du germe qui nous intéresse, à savoir *Listeria monocytogenes*, dont les caractéristiques ubiquitaire et de résistance face à des conditions extrêmes de pH, de salinité, d'humidité et de température seront très importantes dans la suite de notre travail, fondamentale lors de l'étude d'une maladie, la description de son agent étiologique entame tout naturellement notre travail. Ces différents paramètres agissent de façon synergique pour inhiber la croissance du germe mais le froid protège paradoxalement *Listeria monocytogenes*. Secondairement, et d'une façon plus analytique, ce travail a étudié l'origine et les facteurs qui permettent la contamination du lait cru, les voies de contamination humaine et, ceux qui favorisent la multiplication de *Listeria monocytogenes* : d'où leur intérêt dans la prévention de nouvelles épidémies. Nous aborderons ensuite *Listeria monocytogenes*, un germe à fort caractère ubiquitaire (présent dans tous les compartiments du milieu extérieur), La listériose, maladie animale et humaine, est décrite avec ses différentes expressions cliniques ainsi que les cas recensés pour aboutir à l'importance de la prévention.

A la lumière de ces éléments nous abordons le quatrième chapitre qui traite des "Méthodes de recherche de *Listeria monocytogenes*".

La mise en place d'une telle recherche a permis non seulement la mise en évidence de la bactérie mais aussi de soulever une attention particulière vu les risques encourus en cas d'épidémie de Listériose.

En Algérie, peu d'études ont été menées. BELLOUNI en 1990 a analysé 35 échantillons et trouvé un positif (3,2%), et ceux de Lebres et MOUFFOK en 2000 ont trouvé un taux de 1,9%. L'étude réalisée par HAMDJ et al. 2007 a révélé 2,61% de *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de lait de ferme récolté dans les régions d'Alger et de Blida. Enfin, BOUAYAD en 2012, en travaillant sur des produits alimentaires prêts à la consommation, a relevé 9,3 % de contamination (Vs 0% en Italie et en Suisse, 1% en Suède, 7% aux Etats Unis d'Amérique, 12% au Canada, 13% au Brésil, 2% en Corée [15.114] et 2, 2% en Iran [115].



### 5.1.1.2. Milieux d'isolement

#### 5.1.1.2.1 Préparation des milieux de cultures

- Préparation de demi Fraser

Mettre en suspension 28,7g de milieu dans 500ml d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir une minute jusqu'à dissolution complète. Stériliser en autoclave à 121C°pendant 15minutes.

Refroidir à 45-50°C et ajouter aseptiquement une fiole de supplément ferrique de citrate d'ammonium, précédemment reconstitué en 5 ml d'eau distillée stérile. Homogénéiser doucement et distribuer dans des récipients stériles. Le milieu préparé doit être stocké à 2-8°C. La couleur devient ambre

- **Préparation de Fraser**

Mettre en suspension 28,7g de milieu dans 500ml d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir une minute jusqu'à dissolution complète. Stériliser en autoclave à 121C°pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50°C et ajouter aseptiquement une fiole de supplément sélective, précédemment reconstitué en 5 ml d'eau distillée stérile. Homogénéiser doucement et distribuer dans les récipients stériles. Le milieu préparé doit être stocké à 2-8°C. La couleur devient ambre

- **Préparation de Palcam**

Mettre en suspension 34,4g de milieu dans 500ml d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir une minute jusqu'à dissolution complète. Stériliser en autoclave à 121C°pendant 15minutes. Refroidir à 45-50°C et ajouter aseptiquement une fiole de supplément sélectif de Listeria de Palcam, précédemment reconstitué en 5 ml d'eau distillée stérile. Homogénéiser doucement et distribuer dans des boîtes de Pétri. Le milieu préparé devrait être stocké à 8-15°C. La couleur est rouge.

- **Préparation d'oxford**

Mettre en suspension 28,7g de milieu dans 500ml d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir une minute jusqu'à dissolution complète. Stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50°C et ajouter aseptiquement une fiole de supplément sélective, précédemment reconstitué en 5 ml d'eau distillée stérile/acétone. Homogénéiser doucement et distribuer dans des boîtes de Pétri. Le milieu préparé doit être stocké à 8-15°C. La couleur devient ambre.

- **Préparation de TSYEA**

Mettre en suspension 51g de milieu dans 500ml d'eau distillée. Bien mélanger et faire dissoudre en chauffant tout en agitant fréquemment. Faire bouillir une minute jusqu'à dissolution complète. Stériliser en autoclave à 121°C pendant 15 minutes. Refroidir à 45-50°C. La couleur devient ambre, légèrement opalescent.

#### 5.1.2- . Méthodes

##### 5.1.2.1- Méthode d'analyse

Notre travail a été fait selon la Norme **ISO 11290-1** qui consiste en la recherche de listeria à partir les denrées alimentaires.

##### 5.1.2.1.1 Mode opératoire

Avec cette méthode, la recherche de *Listeria monocytogenes* se fait selon le protocole suivant :

Jour 1 : Enrichissement primaire.

Prélever 25 millilitres de lait cru à analyser dans 1 sachet stérile de type Stomacher, contenant 225 ml de bouillon demie Fraser additionné de ses suppléments. On l'incube à 30°C pendant 18 à 24 heures.

Jour 2 : Enrichissement secondaire et premier isolement.

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

D'une part, enrichissement secondaire sur milieu sélectif de Fraser en tube à raison de 0,1 ml, à incuber à 37°C pendant 48 heures, d'autre part, à l'isolement sur gélose Palcam et Oxford, à incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Jour 3 : première lecture

Faire une première lecture des boîtes de Pétri en cherchant les colonies caractéristiques. Dans les cas de forte suspicion, procéder à une purification sur gélose TSYEA dans le cas contraire ré-incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

Jour 4 : relecture, identification et deuxième isolement.

Les colonies caractéristiques ayant poussé sur gélose Palcam, Oxford ou TSAYE feront l'objet d'une identification basée sur :

- Test de catalase
- Coloration de GRAM
- une galerie biochimique miniaturisée de type API – Listeria.

Un deuxième isolement à partir du deuxième milieu d'enrichissement (Fraser) sur gélose Palcam ou Oxford à incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Jour 5 : première lecture des boîtes de Pétri se fait en cherchant les colonies caractéristiques. Dans les cas de forte suspicion, procéder à une purification sur gélose TSYEA dans le cas contraire ré-incuber les boîtes à 37°C pendant 24 h.

Jour 6 : relecture, identification et deuxième isolement.

Les colonies caractéristiques ayant poussé sur gélose Palcam, Oxford ou TSAYE feront l'objet d'une identification basée sur :

- Test de catalase
- Coloration de GRAM
- une galerie biochimique miniaturisée de type API – Listeria.

## 5.1.2.2 - Identification du genre

- Test de la catalase

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. Il faut observer immédiatement et après 5 minutes s'il y a apparition (catalase positive) ou absence (catalase négative) de bulles d'oxygène. Dans le cas où il y a doute, recouvrir chacune des gouttes avec lamelle de microscope et comparer l'apparition des bulles sous les

deux lamelles. Les observations peuvent se faire macroscopiquement ou à l'aide d'un microscope à faible grossissement.

Les *Listeria* sont catalase positive

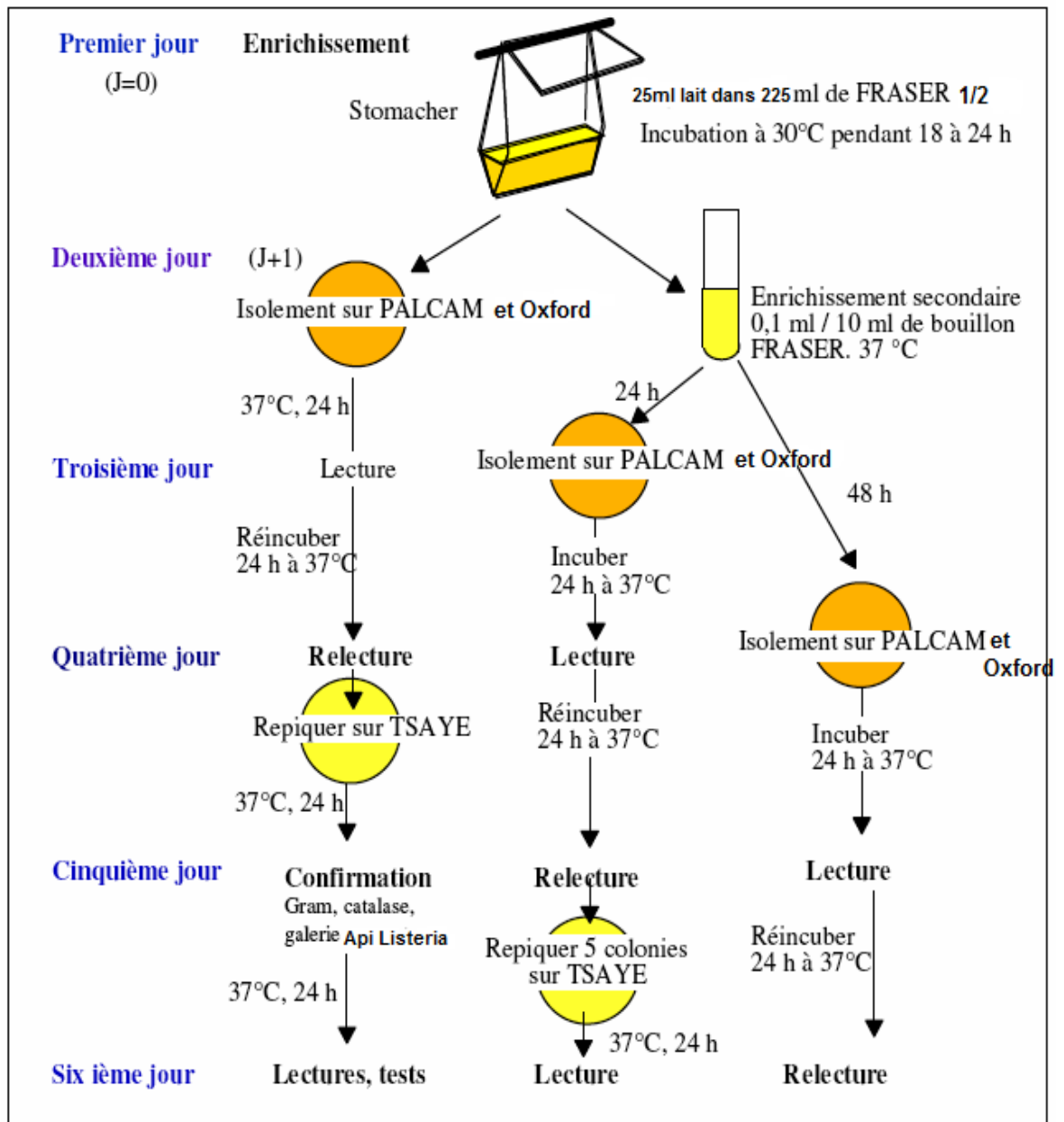


Figure 5.1 : Etapes de la méthode ISO 11290-1

- **Coloration de gram**

- **Mode opératoire**

- Préparation d'un frottis**

1. Déposer une gouttelette d'eau du robinet dans la zone délimitée.
2. Flamber l'anse de platine jusqu'à ce qu'elle devienne rouge.

3. Trouver une colonie isolée sur la gélose
4. Toucher à cette colonie avec l'anse de repiquage.
5. Émulsionner les bactéries prélevées dans la gouttelette d'eau.
6. Flamber l'anse de repiquage jusqu'à ce qu'elle devienne rouge. Laisser refroidir.
7. Fixer le frottis à la chaleur.

### **Technique**

1. Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet durant 1 mn.
2. Lavage à l'eau en transvasant les lames ou sous le robinet. Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
3. Laver à nouveau à l'eau.
4. Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
5. Laver à l'eau.
6. Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
7. Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant vers 50°. Les lames doivent être parfaitement sèches.
8. Observer à l'objectif x 100, en immersion avec de l'huile à immersion.

Les listeria sont des petits bacilles à Gram positifs, en forme de « V » ou de « L ».

#### 5.1.2.3 Identification de l'espèce

##### a)- Galerie Biochimique

##### \* API Listeria :

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 au genre Listeria. La galerie API Listeria comporte 10 micro tubes ou cupules contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques.

La dénomination des substrats contenus dans les cupules, est comme suit :

- DIM: Différentiation entre *L. innocua* et *L. monocytogenes*.
- ESC: Esculine.



- $\alpha$ MAN :  $\alpha$ Mannosidase.
- DARL : D-Arabitol.
- XYL : D-Xylose.
- RHA : Rhamnose.
- MDG :  $\alpha$ -Méthyl-D-Glucoside.
- RIB : Ribose.
- G1P : Glucose - 1 – Phosphate.
- TAG : D-Tagatose.
- $\beta$  HEM : Hémolyse.

**Mode Opérateur :**

- Ouvrir une ampoule de suspension Médium, puis prélever à l'aide d'une pipette, quelques colonies isolées pour réaliser une suspension.
- Ouvrir la 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.
- 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  $\mu$ l soit 2 gouttes de pipette Pasteur en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.

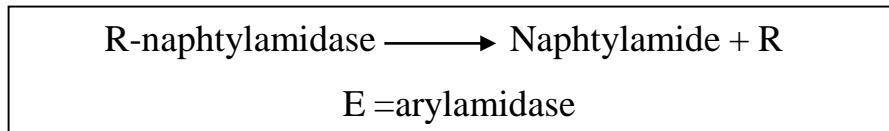
En ce qui concerne les autres tests, remplir uniquement la partie basse des cupules des tests ESC à TAG, soit environ 50  $\mu$ l ou 1 goutte de pipette Pasteur.

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

## Réactions

Les réactions produites durant la période d'incubation à savoir l'acidification des sucres et l'hydrolyse de l'esculine, se traduisent par des changements de coloration spontanés ou révélés par l'addition d'un réactif.

- Le test DIM est fondé sur l'hydrolyse d'un substrat naphtylamide par une arylamidase. La réaction est la suivante :

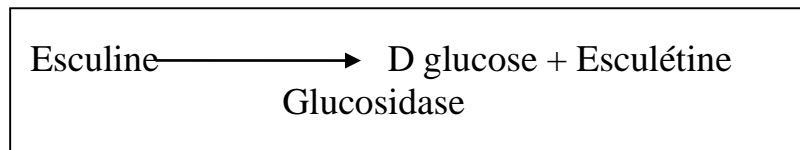


**R** = radicale acide aminé.

**E** = Arylamidase.

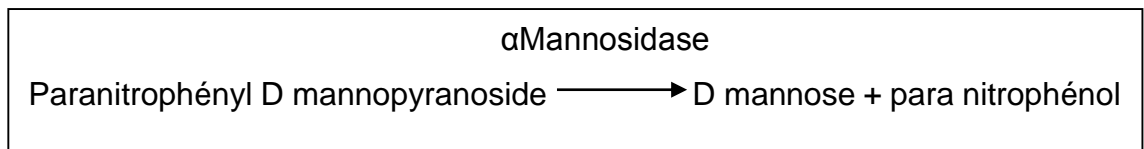
Dans la réaction, on détecte la naphtylamide, par le réactif **ZYM B** qui est un **sel de diazonium**, pour former un composé azoïque coloré en orange, et seul *Listeria innocua* possède l'arylamidase.

- Le test à l'Esculine est basé sur l'hydrolyse de l'Esculine par la glucosidase. La réaction est la suivante :



La détection de l'esculine positive se fait par la formation d'un complexe marron foncé à noir. Toutes les *Listeria* sont esculine positif.

- Le test Mannosidase est un test chromogénique fondé sur l'hydrolyse du paranitrophényl D mannopyranoside par l'enzyme  $\alpha$  mannosidase. La réaction est la suivante :



Le D mannose + para nitrophénol confère une coloration jaune au test dans les cas positifs, sinon le test reste incolore.

- Les sept substrats glucidiques restants sont testés en fermentation : la fermentation se déroule en anaérobiose et fait varier l'indicateur de pH (rouge de phénol) du rouge au jaune voire au jaune orangé.

## Lecture des réactions

Après incubation de 18 à 24 heures à 35 - 37°C, 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 *Listeria monocytogenes* pour laquelle il est négatif et *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 II, relatif à la liste des profils numériques (Appendice B).

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 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil de 4 chiffres est obtenu. L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste des profils qui figure dans l'Appendice B.

Tableau 5.2 : Lecture & Interprétation des caractères portés sur la galerie API

Tests	Reactions	Résultats	
		Négatifs	Positifs
DIM	Differentiation	Orange pâle	Orange
	<i>Listeria innocua</i> /	Rose beige	
ESC	Esculine ( hydrolyse )	Jaune pâle	Noir
$\alpha$ MAN	$\alpha$ MANnosidase	Incolore	Jaune
DARL	D-Arabitol ( Acidification )	Rouge	Jaune
XYL	D-XYlose ( Acidification )	Rouge-orangé	Jaune-orangé
RHA	RHAmnose ( Acidification )		
MDG	&Méthyl-D-Glucoside		
RIB	RIBose (Acidification)		
G1P	Glucose - 1 - Phosphate		
TAG	D-TAGatose		

## 5.2- Résultats

### 5.2.1- Résultats de l'analyse bactériologique

Tableau 5.3 : Résultats des analyses bactériologique et taux de *Listeria spp.*

Région	Mois	Prélèvements (n)	Positifs	Taux (%)
Bougaa (W.Sétif)	janvier	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	2	0.79
Sidi okba (W. Biskra)		12	0	0.00
Bougaa (W.Sétif)	février	12	3	1.19
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	0	0.00
Bougaa (W.Sétif)	Mars	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	1	0.40
Bougaa (W.Sétif)	Avril	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	1	0.40
Bougaa (W.Sétif)	Mai	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	0	0.00
Bougaa (W.Sétif)	Aout	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	0	0.00
Bougaa(W.Sétif)	Octobre	12	0	0.00
Djerma (W.Batna)		12	0	0.00
Sidi okba (W. Biskra)		12	0	0.00
	Total	252	7	2.77

Sur 252 prélèvements analysés, on a enregistré :

- 07 cas positifs, soit un taux de 2.77%.
- 245 cas négatifs, soit un taux de 97.23%.

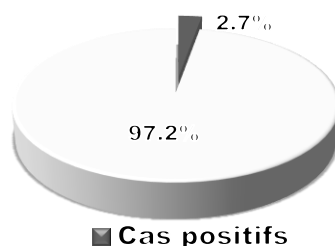


Figure 5.2: Fréquence de *Listeria spp.* dans le lait cru.

## 5.2.2- Facteurs influençant la fréquence de *Listeria spp.*

### 5.2.2.1 - Fréquence de *Listeria spp* par mois

Le taux de listeria spp est différent d'un mois à un autre avec un taux plus important au mois de février 1.19% et des taux de 0 % dans les mois de Mai, Aout, Octobre.

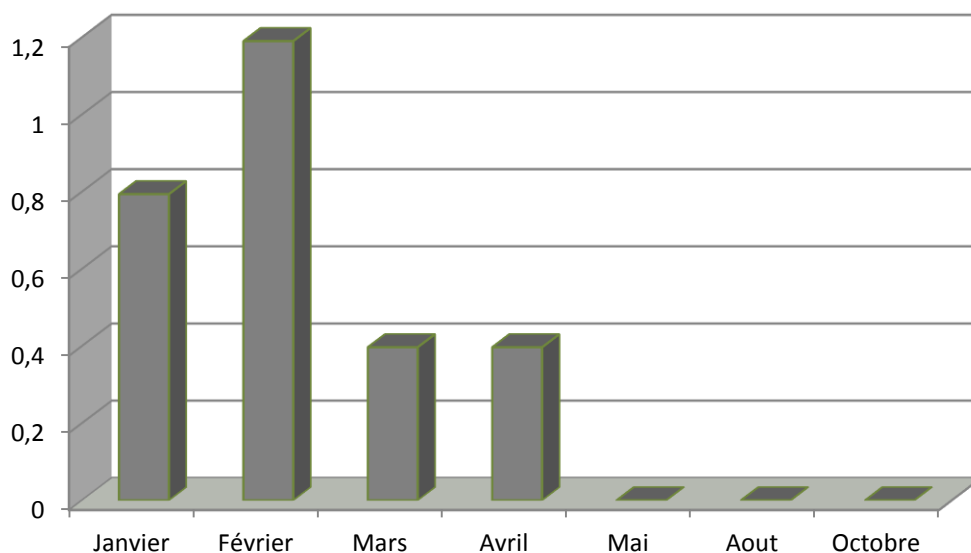


Figure 5.3: Fréquence mensuelle de *Listeria spp.*

### 5.2.2.2 - Fréquence de *Listeria spp* par saison

Tableau 5.4 : Fréquence de *Listeria spp* par saison.

Saison	Cas positifs	Taux de <i>Listeria spp</i> (%)
Hiver	5	1.98
Printemps	2	0.79
Été	0	0.00
Automne	0	0.00

Le taux de *Listeria spp* est différent d'une saison à une autre avec un taux plus important en hiver 1.98 et des taux de 0% en été et en automne.

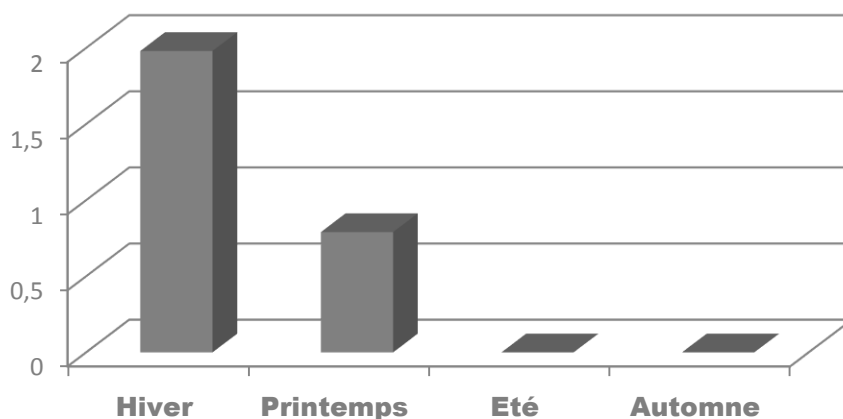


Figure 5.4: Fréquence de *Listeria spp* par saison.

### 5.2.2.3- Fréquence de *Listeria* selon l'espèce

Tableau 5.5: Fréquence de *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

Région	Nombre Prélèvements	Nombre		Fréquence	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
Bougaa w .Sétif	252	2	1	0.79	0.4
Djerma w .Batna		1	1	0.4	0.4
Sidi okba w .Biskra		0	2	0	0.79
	Total	3	4	1.19	1.59

Taux de *L.innocua* est plus important que le taux de *L.monocytogenes*.

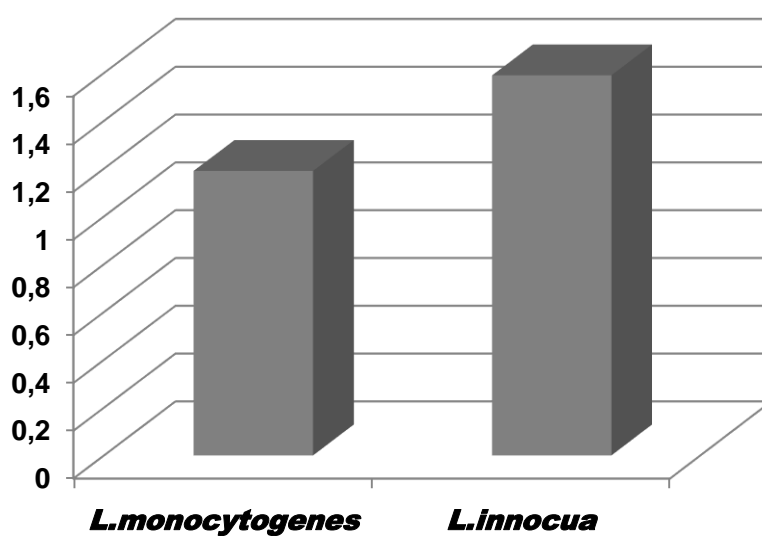


Figure 5.5: Fréquence de *L.monocytogenes* et *L.innocua* dans le lait cru.

#### 5.2.2.4- Fréquence de *Listeria spp* par région

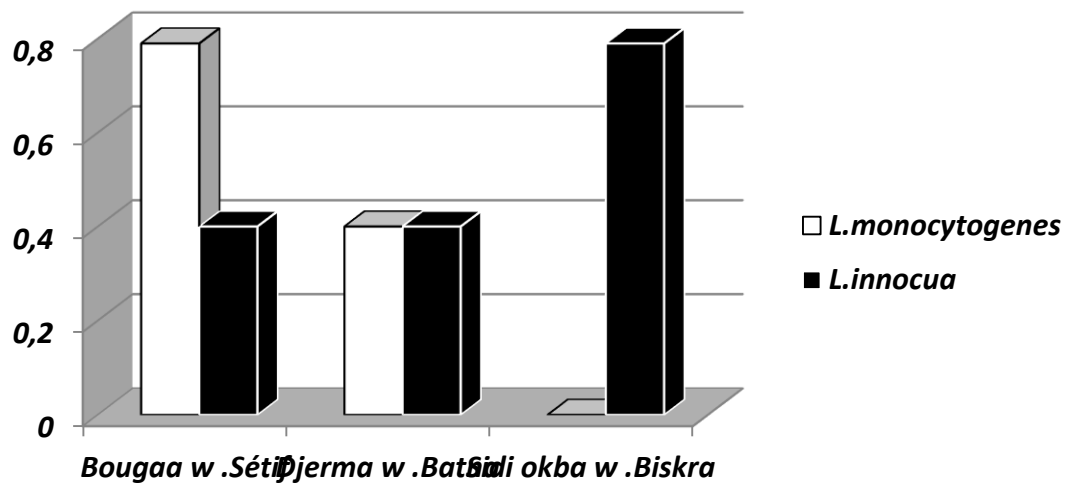


Figure 5.6 : Fréquence de *Listeria spp* par région

Taux de *Listeria* a été différent d'une région à une autre. Il y a une absence totale de *L. monocytogenes* dans la région de sidi okba, contrairement à *L.innocua* qui est omniprésente dans les communes étudiées.

#### 5.2.3- Résultats de l'analyse statistique

Nous avons confronté les données brutes de nos résultats à une analyse statistique afin de rechercher l'éventualité d'une corrélation entre un ou plusieurs facteurs épidémiologiques de la zone d'élevage et la présence de *Listeria spp*. Pour ce faire, le test d'indépendance du Khi-carré ( $\chi^2$ ) de PEARSON (1857-1936) a été utilisé. Il est important de noter que l'expression du test du  $\chi^2$  recouvre plusieurs tests statistiques :

- Test d'ajustement ou d'adéquation, qui compare globalement la distribution observée dans un échantillon statistique à une distribution théorique, celle du  $\chi^2$ .
- Test d'indépendance du  $\chi^2$  qui permet de contrôler l'indépendance de deux caractères dans une population donnée.
- Test d'homogénéité du  $\chi^2$  qui teste si des échantillons sont issus d'une même population.

Le test qui nous intéresse ici est uniquement le test d'indépendance du  $\chi^2$ . Il sert à apprécier l'existence ou non d'une relation entre deux caractères au sein d'une

population, lorsque ces caractères sont qualitatifs où lorsqu'un caractère est quantitatif et l'autre qualitatif, ou bien encore lorsque les deux caractères sont quantitatifs mais que les valeurs ont été regroupées. Il permet de contrôler l'existence d'une dépendance mais en aucun cas le sens de cette dépendance. La figure 5.7, analyse les résultats de notre travail par apport à la fréquence de *Listeria* spp en fonction de la saison.

The screenshot shows the Statistica software interface with a data table. The table has three columns: '1 IDENTIFICATION DE LISTERIA, SPP', '2 SAISON', and '3 POIDS'. The data is as follows:

	1 IDENTIFICATION DE LISTERIA, SPP	2 SAISON	3 POIDS
1	POSITIVE	HIVER	5
2	NEGATIVE	HIVER	67
3	POSITIVE	PRINTEM	2
4	NEGATIVE	PRINTEM	106
5	POSITIVE	ETE	0
6	NEGATIVE	ETE	36
7	POSITIVE	AUTOMN	0
8	NEGATIVE	AUTOMN	36

The software interface includes a menu bar with options like 'Fichier', 'Edition', 'Affichage', 'Insertion', 'Format', 'Statistiques', 'Graphiques', 'Outils', 'Données', 'Fenêtre', and 'Aide'. The status bar at the bottom shows 'Ajoute un document à un Classeur', 'C8,V3', '36 Filtre : Non', 'Pond. : Oui', and 'MAJ'.

Figure 5.7: Fréquence de *listeria* spp en fonction de la saison («Statistica version 6»)

Pour savoir si la saison a une influence significative sur la présence de *Listeria* spp., un test du  $\chi^2$  a été réalisé en utilisant le logiciel STATISTICA version 6. Le traitement de ces données a donné le résultat suivant :



Synthèse : Effectifs Théoriques (Feuille de données1)  
 Effectifs en surbrillance > 10  
 Chi<sup>2</sup> de Pearson : 7,02857, dl=3, p=,070999

IDENTIFICATION DE LISTERIA SPP	SAISON HIVER	SAISON PRINTEMPS	SAISON ETE	SAISON AUTOMNE	Totaux Ligne
POSITIVE	2,00000	3,00000	1,00000	1,00000	7,00000
NEGATIVE	70,00000	105,00000	35,00000	35,00000	245,00000
Ts Grpes	72,00000	108,00000	36,00000	36,00000	252,00000

Table de Fréquences - Synthèse (Feuille de données1) Synthèse : Effectifs Théoriques (Feuille de données1)

Pour l'Aide, appuyez sur la touche F1 C1.V1 POSITIVE

**Figure 5.8:** Traitement des données de la fréquence de *Listeria spp* Vs Saison

Les résultats de l'analyse statistique montrent une différence non significative de l'effet de la saison par rapport à la présence ou la non présence de *Listeria spp* avec une probabilité  $P=0.070999$  ( $P>0,05$ ).

Le test du  $\chi^2$ , nous a apporté une information supplémentaire qui nous permet d'affirmer que le facteur saison est indépendant du résultat de la présence ou la non présence de *Listeria spp* des échantillons choisis.

### III- DISCUSSION

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru bovin par la méthode ISO 11290-1. Cette méthode nécessite 2 étapes successives d'enrichissement (primaire et secondaire), une étape d'isolement et une de confirmation :

- L'enrichissement primaire se fait sur un bouillon demi-Fraser, à raison de 25ml de lait cru dans 225ml de milieu, dans des sachets de Stomacher. On incube pendant 24 heures à 30° C. Après l'incubation, on remarque un noircissement dans certains sachets et l'absence dans d'autres. Ce noircissement est dû à l'hydrolyse de l'esculine, qui réagit avec les ions ferriques. On passe à l'enrichissement secondaire d'une part, d'autre part, à l'isolement sur gélose Palcam et Oxford. Puis, on incube à 37°C.
- L'enrichissement secondaire se fait sur milieu sélectif de Fraser entube, à raison

de 0,1ml de la préparation précédente (demi fraser+lait cru après incubation) dans 10ml de fraser en tube. Incuber 48 heures à 37°C. On remarque un noircissement dans certains sachets et l'absence dans d'autres. Ce noircissement est dû aussi à l'hydrolyse de l'esculine, qui réagit avec les ions ferriques.

L'isolement est réalisé sur milieu Palcam et Oxford, incubé à 37°, après 24 à 48H.

Sur les 252 échantillons analysés nous avons suspecté 07échantillons pouvant contenir le genre *Listéria*.

Sur milieu Oxford, les colonies des échantillons suspects, sont présentes sous forme de petites colonies grisâtres entourées d'un halo noirâtre après 24h d'incubation et, deviennent plus foncées avec des reflets verdâtres. Elles présentent un diamètre d'environ 2mm entourées d'un halo noirâtre et présentent une dépression centrale. Après 48 heures. Le noircissement est aussi attribué a l'hydrolyse de l'esculine, qui réagit avec les ions ferriques.

Sur milieu Palcam, les colonies sont présentées sous forme de petites colonies grisâtres ou vert olives avec parfois un centre noirâtre entouré toujours d'un halo noirâtre après 24h d'incubation. *Listeria* se présente sous forme des colonies vertes de 1,5mm à 2mm de diamètre, avec une dépression centrale entourée d'un halo noirâtre, âpres 48heures.

Avant de passer à l'identification on a réalisé un deuxième isolement sur le milieu TSYEA.

Sur milieu TSYEA, les colonies typiques ont un diamètre de 1mm à 2mm, convexes, incolores, translucides, à bord réguliers après 24H d'incubation à 37°C

Les 07 échantillons suspects ont présenté des colonies typiques de *Listeria* sur les 3 milieux précédents qui ont fait l'objet d'une confirmation et d'une identification biochimique sur galerie Api *Listeria*.

Pour la Confirmation : *Listeria* est catalase positif et Gram positif

Pour l'identification biochimique : la galerie API *Listeria* comporte 10 micro-tubes ou cupules contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques. Après la préparation de la suspension bactérienne (5 colonies + suspension medium), on répartit environ 5 ml d'eau distillée

stérile du fond pour créer une atmosphère humide et, on répartit la suspension bactérienne précédente dans les cupules ou micro-tubes en évitant d'introduire des bulles d'air.

Pour le test DIM, on remplit environ 100 µl soit 2 gouttes de pipette Pasteur en veillant à ne pas créer un ménisque convexe. Pour les autres tests on remplit uniquement la partie basse des cupules des tests ESC à TAG, soit environ 50 µl ou 1 goutte de pipette Pasteur. L'incubation se fait à 35 - 37 °C, pendant 18 à 24 heures en aérobose.

Après, on ajoute 1 goutte de réactif ZYM B au test DYM et on laisse agir pendant 3 minutes.

On note ensuite toutes les réactions positives par le signe (+) et les réactions négatives par le signe (-). On code par la suite les réactions obtenues en un profil numérique, L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste des profils numériques (Annexe II).

Pour les 07 échantillons suspects, après utilisation d'une galerie biochimique spécialement conçue pour les espèces *Listeria* (API *Listeria*), nous avons infirmé la présence de *Listeria spp.* soit un taux de 2.77%.

En revanche, l'identification biochimique a montré la prédominance de *Listeria innocua* avec un taux de 1.59% et, *L. monocytogenes* avec un taux de 1.19%.

Cette prédominance a été expliquée lors d'une étude européenne menée dans 19 laboratoires de 14 pays différents, de façon à mesurer les performances de la méthode normalisée et notamment la précision. Chacun des laboratoires a analysé 3 types de matrices artificiellement contaminées à 3 niveaux de 5 à 100 Unités Formant Colonies (UFC)/25g]. Globalement, les résultats ont montré que la méthode présentait une sensibilité de 85,2 % et une spécificité de 97,4 %. Il n'a pas été montré de différences dans les performances des deux milieux sélectifs employés, Oxford et PALCAM. De plus des faux négatifs ont été obtenus lorsque les catégories d'aliments analysés contenaient des forts taux de *L. innocua*. Ainsi, il a été démontré que durant les étapes d'enrichissement, *L. innocua* devenait la population dominante et pouvait masquer la présence de *L. monocytogenes* après isolement sur milieu sélectif. Dans la plupart des cas, *L. monocytogenes* n'a pas été détectée au stade du premier enrichissement mais seulement après un deuxième enrichissement.

Même de faibles quantités de *L. innocua* peuvent masquer la présence de *L. monocytogenes* à l'issue de la procédure d'enrichissement [117] ; [118];[119] *L. innocua* aurait un« avantage sélectif » sur *L. monocytogenes* par une croissance plus rapide en bouillons sélectifs (de type Fraser) ce qui conduit à des rapports de concentration *L. monocytogenes* / *L. innocua* très faibles. D'après Beumer [120], cette différence serait due à l'acriflavine, à laquelle *L. monocytogenes* serait plus sensible que *L. innocua*. D'autres auteurs suggèrent que l'avantage en faveur de *L. innocua* au cours de la procédure d'enrichissement pourrait être dû à une inhibition de *L. monocytogenes* par *L. innocua* [121]. En effet, un effet inhibiteur de *L. innocua* a été bien démontré contre *L. monocytogenes* [121] ; [122]. Le mécanisme en serait une production de bactériocine, ou plus vraisemblablement des particules phagiques. On peut supposer que cette action s'exprime de façon plus forte dans un milieu liquide d'enrichissement (libre diffusion des particules) qu'*in situ* dans l'aliment solide.

Le taux de 1,19%, de *Listeria monocytogenes*, obtenu lors de cette étude est d'une part, similaire à ceux rapportés en France par Larpent J.P (1995), soit 1,90% ; en Espagne par Soriano J.M (2000), soit 2,90% ; en République Tchèque par I Holko et coll (2001), soit 2,56% et, en Algérie par Lebres et Guetarni (2002), soit 1,96%.

D'autre part, notre taux est inférieur à celui rapporté en Turquie par Gülhan Vardar Ünlü et coll (2000), soit 4% et, aux USA par Van Kessel J.S. (2004), soit 6,5%.

Il va cependant de soit qu'une telle fréquence de contamination fait de ces denrées alimentaires des produits à risque en matière de listériose, dont la stabilité microbiologique dépend essentiellement de leurs conditions de conservation.

Le faible taux d'isolement de *Listeria spp.* Peut-être dû à :

- Un développement d'*Enterococcus*, *Lactococcus*, et les bactéries lactiques qui secrètent des bactériocines et enterocines (A) inhibiteurs de *Listeria spp.* (Hécharde *et al.* 1993; Klocke *et al.* 2005 ; Guerrieri *et al.* 2009 ; Chen *et al.*, 2009). [123.124.125.126].
- Les travaux de Huang *et al.* (2009) [127] ont montré également l'inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* par les pediocines 05-10.

- La production de bactériocine inhibitrice de *Listeria monocytogenes*, selon Choi *et al.* (2000) [128] cité par Bayoub *et al.* (2006) [129], est influencée par le pH du milieu de culture. Le maximum de production de la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis subsp lactis* A164 est observé à pH 6.
- L'utilisation limitée des ensilages (dans notre pays) dans l'alimentation du bétail.

Le pourcentage de listeria, obtenu durant l'hiver est de 1.98% nettement supérieur à celui obtenu durant le printemps 0.79% et l'été 0%

Nous avons noté, compte tenu de la situation géographique, que l'incidence de *Listeria spp.* (2,77 %) est plus faible à Biskra et à Batna (0,8 %). Cette différence pourrait être associée à la différence climatique plutôt qu'aux facteurs liés à la traite ou aux conditions d'hygiène, car sur ce plan, aucune différence entre les deux wilayas n'a été observée.

L'effet saison n'a pas été cité par beaucoup d'auteurs ; contrairement à l'effet de la température de croissance. Les variations saisonnières de l'incidence de *Listeria spp* dans le lait cru ont été rapportées par Rea *et al.* (1992), Sanaa *et al.* (1993) et Gaya *et al.* (1996) [122. 130. 131].

Ainsi, notre étude a apporté un renseignement supplémentaire quant à l'incidence saisonnière de *L. monocytogenes*. Nous avons noté une contamination du lait par *Listeria spp* en fonction de la saison du prélèvement. En effet, il ressort que cette incidence est plus prononcée pendant les mois d'hiver (1.98 %), et ne dépasse pas 0,79 % au printemps. Par contre, en automne et en été, *Listeria spp.* n'a pas du tout été isolée sur la totalité des échantillons analysés.

Certains auteurs [132] ont rapporté que la contamination du lait cru par *Listeria spp.* est d'habitude plus courante en hiver, vraisemblablement à cause de l'alimentation par ensilage qui est la plus répandue en cette saison dans beaucoup de parties du monde. Kalac (2010) [133] affirme dans son étude que l'ensilage est une riche source de contamination par des bactéries indésirables telles que *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Clostridium tyrobutyricum*. Il ajoute que l'occurrence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage est associée aux processus bactériens anaérobies qui abiment la qualité hygiénique et nutritionnelle des ensilages et que la croissance de la bactérie devient importante lorsque la tension en oxygène est élevée et lorsque les valeurs de pH avoisinent 4,4. Il ajoute à ces facteurs, la mauvaise qualité de

l'ensilage due à une faible acidité à cause d'une fermentation lactique inappropriée, ou une détérioration aérobie.

Selon les analyses statistiques de Vilar et al. (2007) [134], la relation entre la mauvaise qualité de l'ensilage (due au pH élevé) et la présence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage est confirmée. Ils notent des taux d'isolement de 29,5 % contre 6,2 % pour un pH au-dessus ou en dessous de 4,5 respectivement. Ces observations sont aussi confirmées par de nombreux auteurs qui ont montré une augmentation du portage des *Listeria spp.* en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent : Le portage de *Listeria spp.* existe dans la plupart des troupeaux (vaches), avec un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons [135].

- Notre analyse statistique a démontré un  $P = 0.070999$  inférieur à 5% et donc, nous avons permis de dire qu'en Algérie, la présence de *Listeria* n'a pas de relation avec la saison, compte tenu de la non utilisation de l'ensilage par les éleveurs laitiers. à 37°C.
- L'enrichissement secondaire se fait sur milieu sélectif de Fraser entubé, à raison de 0,1ml de la préparation précédente (demi fraser+lait cru après incubation) dans 10ml de fraser en tube. Incuber 48 heures à 37°C. On remarque un noircissement dans certains sachets et l'absence dans d'autres. Ce noircissement est dû aussi à l'hydrolyse de l'esculine, qui réagit avec les ions ferriques.

L'isolement est réalisé sur milieu Palcam et Oxford, incubé à 37°, après 24 à 48H.

Sur les 252 échantillons analysés nous avons suspecté 07 échantillons pouvant contenir le genre *Listéria*.

Sur milieu Oxford, les colonies des échantillons suspects, sont présentes sous forme de petites colonies grisâtres entourées d'un halo noirâtre après 24h d'incubation et, deviennent plus foncées avec des reflets verdâtres. Elles présentent un diamètre d'environ 2mm entourées d'un halo noirâtre et présentent une dépression centrale. après 48 heures. Le noircissement est aussi attribué à l'hydrolyse de l'esculine, qui réagit avec les ions ferriques.

Sur milieu Palcam, les colonies sont présentées sous forme de petites colonies grisâtres ou vert olives avec parfois un centre noirâtre entouré toujours d'un halo noirâtre après 24h d'incubation. *Listeria* se présente sous forme des colonies vertes

de 1,5mm à 2mm de diamètre, avec une dépression centrale entourée d'un halo noirâtre, après 48heures.

Avant de passer à l'identification on a réalisé un deuxième isolement sur le milieu TSYEA.

Sur milieu TSYEA, les colonies typiques ont un diamètre de 1mm à 2mm, convexes, incolores, translucides, à bord réguliers après 24H d'incubation à 37°C

Les 07 échantillons suspects ont présenté des colonies typiques de *Listeria* sur les 3 milieux précédents qui ont fait l'objet d'une confirmation et d'une identification biochimique sur galerie Api *Listeria*.

Pour la Confirmation : *Listeria* est catalase positif et Gram positif

Pour l'identification biochimique : la galerie API *Listeria* comporte 10 micro-tubes ou cupules contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques. Après la préparation de la suspension bactérienne (5 colonies + suspension medium), on répartit environ 5 ml d'eau distillée stérile du fond pour créer une atmosphère humide et, on répartit la suspension bactérienne précédente dans les cupules ou micro-tubes en évitant d'introduire des bulles d'air.

Pour le test DIM, on remplit environ 100 µl soit 2 gouttes de pipette Pasteur en veillant à ne pas créer un ménisque convexe. Pour les autres tests on ne remplit uniquement la partie basse des cupules des tests ESC à TAG, soit environ 50 µl ou 1 goutte de pipette Pasteur. L'incubation se fait à 35 - 37 °C, pendant 18 à 24 heures en aérobiose.

Après, on ajoute 1 goutte de réactif ZYM B au test DYM et, on laisse agir pendant 3 minutes.

On note ensuite toutes les réactions positives par le signe (+) et les réactions négatives par le signe (-). On code par la suite les réactions obtenues en un profil numérique, L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste des profils numériques (Cf. Appendice B)

Pour les 07 échantillons suspects, après utilisation d'une galerie biochimique spécialement conçue pour les espèces *Listeria* (API *Listeria*), nous avons infirmé la

présence de *Listeria spp.*, soit un taux de 2.77%.

En revanche, l'identification biochimique a montré la prédominance de *Listeria innocua* avec un taux de 1.59% et, *L. monocytogenes* avec un taux de 1.19%.

Cette prédominance a été expliquée lors d'une étude européenne menée dans 19 laboratoires de 14 pays différents, de façon à mesurer les performances de la méthode normalisée et notamment la précision. Chacun des laboratoires a analysé 3 types de matrices artificiellement contaminées à 3 niveaux [de 5 à 100 Unités Formant Colonies (UFC)/25g]. Globalement, les résultats ont montré que la méthode présentait une sensibilité de 85,2 % et une spécificité de 97,4 %. Il n'a pas été montré de différences dans les performances des deux milieux sélectifs employés, Oxford et PALCAM. De plus des faux négatifs ont été obtenus lorsque les catégories d'aliments analysés contenaient des forts taux de *L. innocua*. Ainsi, il a été démontré que durant les étapes d'enrichissement, *L. innocua* devenait la population dominante et pouvait masquer la présence de *L. monocytogenes* après isolement sur milieu sélectif. Dans la plupart des cas, *L. monocytogenes* n'a pas été détectée au stade du premier enrichissement mais seulement après un deuxième enrichissement.

Même de faibles quantités de *L. innocua* peuvent masquer la présence de *L. monocytogenes* à l'issue de la procédure d'enrichissement [117] ; [118];[119] *L. innocua* aurait un « avantage sélectif » sur *L. monocytogenes* par une croissance plus rapide en bouillons sélectifs (de type Fraser) ce qui conduit à des rapports de concentration *L. monocytogenes* / *L. innocua* très faibles. D'après BEUMER [120], cette différence serait due à l'acriflavine, à laquelle *L. monocytogenes* serait plus sensible que *L. innocua*. D'autres auteurs suggèrent que l'avantage en faveur de *L. innocua* au cours de la procédure d'enrichissement pourrait être dû à une inhibition de *L. monocytogenes* par *L. innocua* [121]. En effet, un effet inhibiteur de *L. innocua* a été bien démontré contre *L. monocytogenes* [121] ; [122].

Le mécanisme en serait une production de bactériocine, ou plus vraisemblablement des particules phagiques. On peut supposer que cette action s'exprime de façon plus forte dans un milieu liquide d'enrichissement (libre diffusion des particules) qu'*in situ* dans l'aliment solide.

Le taux de 1,09%, de *Listeria monocytogenes*, obtenu lors de cette étude est d'une part, similaire à ceux rapportés en France par LARPENT J.P (1995), soit 1,90% ; en Espagne par SORIANO J.M (2000), soit 2,90% ; en République Tchèque par



HOLKOETCOLLI (2001), soit 1,56% et, en Algérie par LABRES et GUETARNI (2002), soit 1,96%.

D'autre part, notre taux est inférieur à celui rapporté en Turquie par GÜLHAN VARDAR ÜNLÜETCOLL (2000), soit 4% et, aux USA par VAN KESSEL J.S. (2004), soit 6,5%.

Il va cependant de soit qu'une telle fréquence de contamination fait de ces denrées alimentaires des produits à risque en matière de listériose, dont la stabilité microbiologique dépend essentiellement de leurs conditions de conservation. Le pourcentage de *Listeria*, obtenu durant l'hiver est de 7.5% nettement supérieur à celui obtenu durant le printemps 5% et l'été 0%. Nous avons noté, compte tenu de la situation géographique, que l'incidence de *Listeria spp.* (4,41 %) est plus faible à Biskra comparativement à Mila (8,33 %). Cette différence pourrait être associée à la différence climatique plutôt qu'aux facteurs liés à la traite ou aux conditions d'hygiène, car sur ce plan, aucune différence entre les deux wilayas n'a été observée. L'effet saison n'a pas été cité par beaucoup d'auteurs ; contrairement à l'effet de la température de croissance. Les variations saisonnières de l'incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru ont été rapportées par REA et al. (1992), SANAA et al. (1993) et GAYA et al. (1996).

Ainsi, notre étude a apporté un renseignement supplémentaire quant à l'incidence saisonnière de *L. monocytogenes*. Nous avons noté une contamination du lait par *Listeria spp.* en fonction de la saison du prélèvement. En effet, il ressort que cette incidence est plus prononcée pendant les mois d'hiver (16,12%), et ne dépasse pas 3,33 % au printemps. Par contre, en automne et en été, *Listeria spp.* n'a pas du tout été isolée sur la totalité des échantillons analysés.

Certains auteurs [125] ont rapporté que la contamination du lait cru par *Listeria spp.* est d'habitude plus courante en hiver, vraisemblablement à cause de l'alimentation par ensilage qui est la plus répandue en cette saison dans beaucoup de parties du monde. KALAC (2011) affirme dans son étude que l'ensilage est une riche source de contamination par des bactéries indésirables telles que *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Clostridium tyrobutyricum*. Il ajoute que l'occurrence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage est associée aux processus bactériens anaérobies qui abiment la qualité hygiénique et nutritionnelle des ensilages et que la croissance de la bactérie devient importante lorsque la tension en oxygène est élevée et lorsque

les valeurs de pH avoisinent 4,4. Il ajoute à ces facteurs, la mauvaise qualité de l'ensilage due à une faible acidité à cause d'une fermentation lactique inappropriée, ou une détérioration aérobie.

Selon les analyses statistiques de VILAR et al. (2007), la relation entre la mauvaise qualité de l'ensilage (due au pH élevé) et la présence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage est confirmée. Ils notent des taux d'isolement de 29,5 % contre 6,2 % pour un pH au-dessus ou en dessous de 4,5 respectivement. Ces observations sont aussi confirmées par de nombreux auteurs qui ont montré une augmentation du portage des *Listeria spp.* en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent : Le portage de *Listeria spp.* existe dans la plupart des troupeaux (vaches), avec un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons [27].

## CONCLUSION

Le genre *Listeria* est ubiquitaire, largement répandu dans l'environnement. Il présente la particularité de pouvoir se développer à des températures aussi basses que +1°C, pouvant de ce fait contaminer fortement certains aliments particulièrement le lait cru.

Les objectifs essentiels de ce travail étaient de mettre en évidence la présence de *Listeria monocytogenes* dans le lait cru bovin. A un taux de 1,64 %, certes faible, mais similaire à celui rapporté par la littérature internationale.

Il ressort de notre travail les points essentiels suivants :

1. Compte tenu de l'ubiquité de *Listeria monocytogenes*, son absence totale dans le lait cru bovin est illusoire.
2. La présence de la listériose dans notre pays est certaine, sans toutefois avoir des données fiables sur la listériose animale et humaine.
3. La présence de *Listeria spp.* dans notre alimentation est un risque réel.
4. Nous sommes quotidiennement exposés au risque de contracter *L. monocytogenes* par ingestion d'aliments contaminés.

Il est donc opportun, de redoubler de vigilance en mettant en place, une réglementation adéquate suivie et contrôlée ainsi qu'une bonne communication sur les risques en vue de sensibiliser au mieux la population sensible exposée au risque d'une éventuelle listériose.

## RECOMMANDATIONS

Le monde agricole est en pleine mutation. L'exercice de la médecine vétérinaire doit s'adapter à cette évolution. Désormais, le vétérinaire ne doit plus jouer le rôle de «pompier» mais doit axer davantage ses efforts sur la prévention et la médecine de troupeau. Pour cela, nous recommandons que les vétérinaires mettent en place des suivis de troupeau. Ceci va leur permettre de collaborer réellement avec l'éleveur afin de corriger ou de prévenir les problèmes récurrents dans l'élevage, c'est-à-dire leur apparition, en définissant les points à risque que nous allons citer ci-dessous :

### ❖ **Au cours d'élevages :**

Rappelons que certains auteurs n'hésitent pas à affirmer que l'utilisation d'ensilage multiplie le risque de 20 à 40 fois, pour un troupeau de contracter la listériose. Mais, comme nous l'avons mentionné, la qualité de l'ensilage intervient sur le risque de contamination. La fréquence d'isolement de *L. monocytogenes* est en général plus élevée lors de mauvaise conservation. Lors d'une recrudescence des cas cliniques de listériose observés dans l'élevage, le vétérinaire doit donc avant tout s'assurer que l'élaboration, la conservation et l'utilisation de l'ensilage se fait dans de bonnes conditions, et mettre en avant les points critiques susceptibles d'augmenter le risque de contamination du silo pour aider à mieux les maîtriser.

- ✓ Dépistage précoce et isolement des animaux malades ou porteurs sains au niveau des élevages intensifs de bovins laitiers modernes, particulièrement dans les cas d'avortements.
- ✓ Dépistage à l'importation, au niveau des lazarets, surtout lorsqu'il s'agit d'importation d'animaux, à partir de pays endémiques.
- ✓ Détruire les cadavres, avortons et placentas.

### ❖ **Contaminations liées au milieu et au matériel :**

Les mesures préventives liées au milieu et au matériel reposent sur une maîtrise du nettoyage et de la désinfection des locaux, du matériel et des ustensiles. Une

attention spécifique doit être portée aux ambiances humides et froides, favorables au développement de *Listeria monocytogenes*.

❖ **Au niveau des laboratoires :**

- ✓ Poursuite de l'enquête sur la Listériose et l'étaler à d'autres produits et dans d'autres régions du pays.
- ✓ Evoluer vers la certification ISO des laboratoires.
- ✓ Mise en place de techniques rapides de type RapidL'mono.

❖ **Au niveau des hôpitaux :**

- ✓ Dépistage précoce de la Listériose particulièrement dans les cas d'avortements chez les femmes enceintes.
- ✓ Mise en place des équipes compétentes chargées des 'enquêtes hospitalières notamment au niveau des services de maternité.
- ✓ Veiller à mettre en place des plans réguliers de nettoyage, de désinfection et de dératisation.

❖ **Au niveau des pouvoir publique :**

- ✓ Mettre en place le plus rapidement possible un système de veille sanitaire.
- ✓ Mise en place et respect des outils de traçabilité.
- ✓ Information et sensibilisation des consommateurs exposés au risque de contamination par *Listeria spp.*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Morse, P. M., Jackson, H., McNaughton, C. H, Leggat, A. G., Landerkin, G. B. et Jons, C. K., 1968.** Investigation of factors contributing to the bacterial count of bulk tank milk II. Bacteria in milk from individual cows. *J. Dairy Sci.* 51: 1188- 1191.
2. **Thomas, S. B. et Thomas, B. F., 1978.** The bacteria content of milking machines and pipeline milking plants. A review: Thermotolerant organisms. *Dairy Ind. Int.* 43 : 17-21,25
3. **Allerberger F., Wagner M.:** Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, 16, 16-23.
4. **Bellouni R. (1990).** *Listeria monocytogenes* : bactériologie et épidémiologie. Thèse Doctorat en sciences médicales, INESM, Univ. d'Alger (USTHB). 165 p.
5. **Sutra L.,Federighi M., Jouve J.L. (1998).** Manuel de bactériologie alimentaire. Edition, Polytechnica, Paris. p.133-159.
6. **Berche P. (1999).** Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. *Infection néonatales II* .Vol 2. P.33-39.
7. **Gillespie S.H., Hawkey P.M. (2006).** Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 604 p.
8. **Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., et al. (2001).** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 584-640.
9. **Larpent J. P. (2004).** *Listeria*. 3ème édition. Technique et documentation. Londres-Paris New York. Lavoisier. ISBN: 2-7430-065769. 227 p.
10. **Graves, L.M., Hesel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B.D., 2010.** *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 60, 1280-1288.
11. **Sukhadeo, B., H. Torsten and C. Trinad (2008).** Comparative Genomics and Evolution of Virulence. *Handbook of Listeria Monocytogenes*, CRC Press. null: 311-335.

- 12. Garrity G. M., Liburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euséby J. and Tindall B. J. (2007).** Taxonomic outline of the bacteria and archaea. Part 9 - The bacteria: Phylum "*Firmicutes*": Class. "*Bacilli*". p. 333- 398.
- 13. Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009).** Family III. *Listeriaceae* fam. nov. In: De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H., Whitman W.B. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 3 (The *Firmicutes*), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. p. 244.
- 14. Bind J.L. (1990)** Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en industries agro-alimentaires Compte rendu de conférences prononcées à l'occasion du séminaire CPCIA d'octobre 1990. APRIA, Paris, 55- 76.
- 15. Jemmi T., Stephan R. (2006)** *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator, *Revue Scientifique et technique- Office international des epizooties*. **25**: 571-580.
- 16. Bornert G. (2000).** Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires, *Revue Méd. Vét.*, **151**(11) : 1003-1010. 580.
- 17. Weiss J., Seeliger H.P.R. (1975).** Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *App1. Microbiol.* **30**, 1, 29-32.
- 18. Jacquet C., Rocourt J. (1993)** Microbiologie des *Listeria* et épidémiologie de la listériose humaine *l'information du Biotechnicien*, 1, N° 1, 11-18
- 19. Guiraud J.P. (1998).** *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod. Paris .652 p.
- 20. Singleton P. (1999).** *Bactériologie*. 4ème Edition. Dunod. Paris. 415 p.
- 21. Frevacque L. (1999)** *Listeria monocytogenes* (page consultée le 31 janvier 2000) Adresse URL : [http : //perso.wanadoo.fr/laufr/Hsteria](http://perso.wanadoo.fr/laufr/Hsteria).
- 22. Way S. S., Thompson L. J., Lopes J. E., Hajjar A. M., Kollmann T. R., Freitag N. E., Wilson C. B. (2004).** Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell. Microbiol.* **6**, 235–242
- 23. National Institutes of Health, United States Department of Health and Human Services, February 2004**
- 24. Premaratne R.J., LIN W.J., Johnson E.A. (1991)** Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria Monocytogenes* *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 3046-3048

25. **Yu L.S.L., Fung D.Y.C. (1991)** Effect of oxyrase <sup>TM</sup> on *Listeria monocytogenes* and other facultative anaerobes *J. Food Saf*, 11, 1991b, 163-175.
26. **Yu L.S.L., Fung D.Y.C. (1992)** Comparisons of selected methods with the Fung-Yu tube procedure for determining *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meats *J Food Protect.*, SS, 349-355
27. **Augustin (jc).** Résistance de *Listeria monocytogenes* aux traitements thermiques. *Pathologie Biologie*. vol 44, n°9, 1996, pp 790–807.
28. **Holt T.G., Krjeg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994)** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams and Wilkins (Eds.), Baltimore, 787 pages.
29. **Larpent J.P. (1995)** *Les Listeria Technique et Documentation*, LAVOISIER, 102 pages + annexe.
30. **Larpent J.P. (2000)** *Les Listeria Technique et Documentation*, LAVOISIER, 106 pages + annexe.
31. **Euzéby (jp).** Bactériologie Vétérinaire : Les Listeria. [www.bacterio.cict.fr/bacdict/nomstaxons.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdict/nomstaxons.html). 25 Juin 2000, pp 1-35.
32. **Rocourt (j) 2002.** Analyse du risque *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. Cours National d'Hygiène et de Microbiologie des Aliments. IPA. Alger, pp 1-62.
33. **Rocourt (j). 2000** *Listeria* et listériose : Position phylogénétique et classification du genre *Listeria*. *Précis de bactériologie clinique*. vol 46, pp 943-952.
34. **Rocourt (j), Bille (j). 1997** Foodborne listeriosis. Rapport trimestriel des statistiques sanitaires mondiales. vol 50, pp 67-73
35. **Doyle M.P. (1988)** Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes* *Food Technol.* 42, 169-171
36. **Bouchon G. (1990)** Présence de *Listeria monocytogenes* dans les aliments: Evaluation du risque - Prévention et Contrôle Thèse de doctorat vétérinaire, faculté de médecine de Nantes, Nantes, 97 pages.
37. **Larpent (jp) 2000** *Les Listeria*. Deuxième Ed.. Lavoisier. ISBN., pp 1-189.
38. **Jacquet C., Rocourt J. (1993)** Microbiologie des *Listeria* et épidémiologie de la listériose humaine *l'information du Biotechnicien*, 1, N° 1, 11-18
39. **Petran R.L., Zotiola E.A. (1989)** A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Protection*, S4(2), 458-460



40. Juntilla J.R., Niemela S.I., Him J. (1988) Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-hemolytic *Listeria* J Appl. Bacteriol., 65, 321-327
41. Seeliger, H.P.R. and Jones D. (1986). Genus *Listeria* Pirie 1940. *In*: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E. and Holt J.H. (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 9<sup>ème</sup> édition. Baltimore: Williams & Wilkins, vol.2, 1235-1245.
42. Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology, 68, 157-162.
43. Larpent, J.P. (2000). *Listeria*. 2<sup>ème</sup> édition. Paris, Tec et Doc. 165 p.
44. Ryser, E. T. et Marth, E. H. (1999). *Listeria*, listeriosis and food safety. 2<sup>ème</sup>.
45. Golden D.A., Beuchat L.R., BRackett R.E. (1988) Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing *Food Microbiol.*, 5(1), 17-23.
46. George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 6, 153-156.
47. Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A. (1989). A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. Journal of Food Protection, 52, 456-458.
48. Sorrells, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection, 52, 571-573.
49. Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T. (1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. Journal of Food Protection, 53: 652-655.
50. Rapport Afssa de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*, (2000). 144.p.
51. Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C. and Lebert, A. (1998). Effects of pH and aw stress on growth of *L. monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 42: 71-77.

- 52. Nolan, D.A., Chamblin, D.C. and Troller, J.A. (1992).** Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 323-335.
- 53. Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M. and Labadie, J. (1999).** Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, **86**, 469-476.
- 54. Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. (1992).** Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* **15**, 103-105.
- 55. Kukharkova, L.L, Boyarshinov, P.K., Adutskevich, V.A. and Perova, P.B. (1960).** Data on the hygienic judgement of meat in case of listeriosis. *Veterinariya*, **37**, 74-79.
- 56. Sielaff, H. von (1968).** Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose. *Monatsch. Veterinärmed*, 21, 750-758.
- 57. Jonhson, J. L., Doyle, M. P., Cassens, R. G. et schoeni, J. L. (1988).** Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Applied and environmental microbiology*, 54, 497-501.
- 58. Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P. 2001.** A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292: 1722-1725.
- 59. Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Sarnacki S, Monnet JP, Berche P, Gaillard JL. 1998.** Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun.* 66(2):747-55
- 60. Pron B, Boumaila C, Jaubert F, Berche P, Milon G, Geissmann F, Gaillard JL. 2001.** Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. *Cell Microbiol.* 3(5):331-40.
- 61. Drevets, D.A. 1999.** Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect Immun* 67: 3512-3517.
- 62. Finlay BB, Cossart P. 1997.** Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science.* 2;276(5313):718-25.

- 63. Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P. 1996.** E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84: 923-932.
- 64. Beauregard KE, Lee KD, Collier RJ, Swanson JA. 1997.** pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med.* 186(7):1159-63.
- 65. Camilli, A., Tilney, L.G., and Portnoy, D.A. 1993.** Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol Microbiol* 8: 143-157.
- 66. Alvarez-Dominguez C, Roberts R, Stahl PD. 1997.** Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 6):731-43.
- 67. Kocks C, Hellio R, Gounon P, Ohayon H, Cossart P. 1993.** Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J Cell Sci.* 105 :699–710.
- 68. Gouin E, Dehoux P, Mengaud J, Kocks C, Cossart P. 1995.** *iactA* of *Listeria ivanovii*, although distantly related to *Listeria monocytogenes actA*, restores actin tail formation in an *L. monocytogenes actA* mutant. *Infect Immun.* 63(7):2729-37.
- 69. Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. 2006.** Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* 8(3):457-70.
- 70. Vasquez-Boland, J.-A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J. & Cossart, P. 1992.** Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 60, 219–230.
- 71. Tilney LG, Portnoy DA. 1997.** Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol.* 109(4 Pt1):1597-608.
- 72. Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. & Cossart, P. (2001).** A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.* 292, 1722-1725.
- 73. Pine, L., Kathariou, S., Quinn, F., George, V., Wenger, J. D. & Weaver, R. E. (1991).** Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. *J Clin Microbiol.* 29, 990-996.

- 74. Roche, S. M., Gracieux, P., Milohanic, E., Albert, I., Virlogeux-Payant, I., Temoin, S., Grepinet, O., Kerouanton, A., Jacquet, C., Cossart, P. & Velge, P. (2005).** Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol.* 71, 6039-6048.
- 75. Groisman EA. 2001b.** Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press.
- 76. Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. 2004.** Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol.*; 58:587-610. Review.
- 77. Gahan CG, Hill C. 2005.** The use of listeriolysin to identify in vivo induced genes in the gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 36(2): 498-507.
- 78. Miller RA, Britigan BE. 1997.** Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev.* 10(1):1-18.
- 79. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL, Messina CG, Bolsover S, Gabella G, Potma EO, Warley A, Roes J, Segal AW. 2002.** Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature.* 416(6878):291-7
- 80. Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vazquez- Boland JA; European Listeria Genome Consortium. 2002.** Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 8;99(1):431-6.
- 81. Riel R., 1984.** Composition et structure physico-chimique du lait. Tiré de Science et technologie du Lait. La fondation de technologie laitière du Québec Inc. 1 : 1-53.
- 82. Sanaa M., Audurier A., Poutrel B., Menard J.L., Serieys F. (1996).** Origin of bovine milk contamination by *Listeria monocytogenes*. *Int. Dairy Fed.* **25**: 163-179. *monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI. 207 p.
- 83. Sanaa M. (1993).** Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria*
- 84. Simon J.L (FRGDS Rhône-Alpes), Pierre Fatet (FDCL de l'Ain) et Marie-Annick Dye, Extrait bulletin GDS38 – mai 2001.**
- 85. Vaissaire, J. (2000)** Epidémiologie des listérioses animales en France. *Bull. Acad. Natle. Méd.* **184**(2): 275-286.

- 86. Blood (h). Médecine Vétérinaire. Deuxième édition : Vigot Frères Paris.1976**, pp 351-354.
- 87. Bienfet V., Lomba F., et Binot H..** Une affection en recrudescence ou trop souvent méconnue ? L'encéphalite à *Listeria monocytogenes*. Annales de médecine vétérinaire. fascicule VI, Tome 113, 1969, pp 345-357.
- 88. Joncour, G. (1998).** Episodes aigus d'uvéite : étude sur quatre troupeaux laitiers au cours du premier trimestre 1997, en Bretagne. Point. Vét. **29** (192): 433-440.
- 89. Ravier, J.F. (2000)** (Communication personnelle).
- 90. Berche, P. (1991).** Pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* : stratégie de survie in vivo d'une bactérie à croissance intracellulaire. Compte-rendus de la conférence internationale : *Listeria* et sécurité alimentaire, Laval, France, 13-14 juin 1991, Asept Editeur, Laval, 77-81
- 91. Cobb, C. A., Curtis, G. D., Bansi, D. S., Slade, E., Mehal, W., Mitchell, R. G. & Chapman, R. W. (1996).** Increased prevalence of *Listeria monocytogenes* in the faeces of patients receiving long-term H2- antagonists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 8, 1071-1074.
- 92. Vaillant, V., de Valk, H., Baron, E. , Ancelle, T., Colin, P., Delmas, M. C., Dufour, B., Pouillot, R., Le Strat, Y., Weinbreck, P., Jouglu, E. & Desenclos, J. C. (2005).** Foodborne infections in France. *Foodborne Pathog Dis.* 2, 221-232.
- 93. Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V. , McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., Griffin, P. M. & Tauxe, R. V. (1999).** Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 5, 607-625.
- 94. Gaillard, J.L., Gholizadeh, Y. and Pron, B. (1995).** Diagnosis of human listeriosis: new approaches. *Med. Mal. infect.* **25**: 251-256
- 95. Shwartz (m). Contribution de l'AFSSA à la concertation sur l'avenir de la recherche de *Listeria monocytogenes*, plan 2002-2005.** France. 2002, pp 1- 12.
- 96. Wherry, J.C., Schreiber, R.D. and Unanue, E.R. (1991).** Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. *Infect. Immun.* **59**: 1709-1715.

- 97. Goossens, P. L., Marchal, G. and Milon, G. (1992).** Transfer of both protection and delayed-type hypersensitivity against live *Listeria* is mediated by the CD8+ T cell subset: a study with *Listeria*-specific T lymphocytes recovered from murine infected liver. *Int. Immunol.* **4**: 596.
- 98. Edelson, B. T., Cossart, P. and Unanue, E. R. (1999).** Cutting Edge: Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to *Listeria* Infection. *J. Immunol.* **163**: 408-409.
- 99.** Prévention de la listériose chez les femmes enceintes, les patients immunodéprimés et les personnes âgées. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 1995 n°23.
- 100. Euzeby J.P. (2000).** Bactériologie vétérinaire: Les *Listeria* [www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html) , pp. 1-35.
- 101. Reglement (CE) n° 853/2004 du Parlement Europeen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des regles specifiques d'hygiene applicables aux denrees alimentaires d'origine animale.**
- 102. Donald AS., Fenlon D.R Seddon B., 1992.** The Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis, 11-14 May 1992, Copenhagen. Book of abstracts, 288-289.
- 103. Fed10 W.M., Schoondrewoerd M., Schuter, Jackson H., 1990.** *Can. Vet. J.*, **31**,733-775.
- 104. Sharp M.W., 1989.** *Vet. Record*, 125,512-513.
- 105. Husu J.R., S. Eppanen J.T., Sivela S.K., Rauramaa A.L., 1990.** *J. Vet. Med.*, **B37**,268-275.
- 106. Bouton, Y., 2011** « Microflore du lait cru : vers une meilleure connaissance des ecosystemes microbiens du lait et de leurs facteurs de variation », P79. URL <http://www.rmtfromagesdeterroirs.com/actions-1/ecosystemes-microbiens> Dernière consultation avril 2013.
- 107. Vaissaire, J. et l'ensemble des directeurs des laboratoires d'analyse départementaux vétérinaires. (1999a).** Les listérioses animales. Epidémiologie. Présentation. Juin 1999. Commission des maladies infectieuses. Acad.Nat. de Médecine.
- 108. Bergholz, T.M., den Bakker, H.C., Fortes, E.D., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2010.** Salt stress phenotypes in *Listeria monocytogenes* vary by genetic lineage and temperature. *Foodborne pathogens and disease* **7**, 1537-1549.

109. **Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J., Wiedmann, M., 2001.** Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology-SGM* 147, 1095-1104
110. Bienfet (v), Lomba (f), et Binot(h). Une affection en recrudescence ou trop souvent méconnue ? L'encéphalite à *Listeria monocytogenes*. *Annales de médecine vétérinaire. fascicule VI, Tome 113, 1969, pp 345-357.*
111. **Joncour, G. (1998).** Episodes aigus d'uvéite : étude sur quatre troupeaux laitiers au cours du premier trimestre 1997, en Bretagne. *Point. Vét.* **29** (192): 433-440.
112. **Ravier, J.F. (2000)** (Communication personnelle).
113. **Berche, P. (1991).** Pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* : stratégie de survie in vivo d'une bactérie à croissance intracellulaire. *Compte-rendus de la conférence internationale : Listeria et sécurité alimentaire, Laval, France, 13-14 juin 1991, Asept Editeur, Laval, 77-81.*
114. **Ha K.S., Park S.J., Seo S.J., Park J.H., Chung D.H. (2002).** Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. *J. FoodProtect.* **65**,1, 111-115.
115. **Moshtaghi H., Mohamadpour A.A. (2007).** Incidence of *Listeria* spp. in Raw Milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathog. Dis.* **4** (1):107-110.
116. **Petran, R.L. and Swanson, K.M.L. (1993).** Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Protect.* **56**: 616-618.
117. **Curiale, M.S. and Lewus, C. (1994).** Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Protect.* **57**: 1048-1051.
118. **McDonald, F. and Sutherland, A.D. (1994).** Important differences between generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two enrichment broths. *J. Dairy Res.* **61**: 433-436.
119. **Beumer, R.R., Te Giffel, M.C. Spoorenberg, E. and Rombouts, F.M. (1996).** *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiol. Infect.* **117**(3): 437-442.
120. **Yokoyama, E., Maryama, S. and Katsube, Y. (1998).** Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 133-137.

121. **Kalmokoff, M.L., Daley, E., Austin, J.W. and Farber, J.M. (1999).** Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.* **50**(5): 191-201.
122. **Rea M.C., Cogan T.M., Tobin S. (1992).** Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J. Appl. Bacteriol* 73 : 331-336.
123. **Sanaa M. (1993).** Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI. 207 p.
124. **Gaya P., Saralegui C., Medina M., Nunez M. (1996).** Occurrence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp. in Raw Caprine Milk. *J. Dairy Science.* **79**: 1936-1941.
125. **Waak E., Tham W., Danielsson-Tham M.L. (2002).** Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 3366-3370.
126. **Vilar, M. J., Yus, E., Sanjuan, M. L., Dieguez, F. J., Rodriguez-Otero, J. L. (2007).** Prevalence of and risk factors for *Listeria species* on dairy farms. *J. Dairy Sci.* **90** : 5083–5088.
127. **AFSSA (2000).** Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. 146 p.



# ANNEXE

## APPENDICE A

### **Supplément Sélective de Fraser :**

(Composition: chaque ampoule pour 500 ml)

Ampoule A: citrate de fer ammoniacal ..... 250 mg

Ampoule B: Acryflavine .....12.5 mg

Acide nalidixique..... 10 mg

### **Supplément Sélective de Demi Fraser :**

(Composition chaque ampoule pour 500 ml:)

Ampoule A: citrate de fer ammoniacal ..... 250 mg

Ampoule B: Acryflavine.....6.25 mg

Acide nalidixique ..... 5 mg

### **Supplément Sélective d'Oxford :**

(Composition chaque ampoule pour 500 ml:)

Cycloheximide ..... 200 mg

Colistine sulfate..... 10 mg

Fosfomycine..... 5 mg

Acryflavine ..... 2.5 mg

Cafetan ..... 1 mg

### **Supplément Sélective de Palcam ;**

(Composition chaque ampoule pour 500ml)

Ceftazidime ..... 10 mg

Polymyxine B Sulfate..... 5 mg

Acryflavine ..... 2.5 mg

## APPENDICE B

21	<i>Listeria ivanovii</i>	37	<i>Listeria ivanovii</i>
21	<i>Listeria ivanovii</i>	37	<i>Listeria ivanovii</i>
22	<i>Listeria ivanovii</i>	60	<i>Listeria monocytogenes</i>
23	<i>Listeria seeligeri / ivanovii</i>	61	<i>Listeria monocytogenes /</i>
23	<i>Listeria welshimeri</i>	61	<i>Listeria grayi</i>
23	<i>Listeria ivanovii</i>	61	<i>Listeria grayi</i>
23	<i>Listeria ivanovii</i>	61	<i>Listeria monocytogenes</i>
23	<i>Listeria ivanovii</i>	63	<i>Listeria seeligeri / welshimeri</i>
23	<i>Listeria ivanovii</i>	63	<i>Listeria welshimeri</i>
24	<i>Listeria monocytogenes</i>	64	<i>Listeria monocytogenes</i>
25	<i>Listeria monocytogenes</i>	64	<i>Listeria monocytogenes</i>
25	<i>Listeria monocytogenes /ivanovii</i>	65	<i>Listeria monocytogenes</i>
27	<i>Listeria welshimeri</i>	65	<i>Listeria grayi</i>
27	<i>Listeria ivanovii</i>	65	<i>Listeria monocytogenes</i>
27	<i>Listeria ivanovii</i>	67	<i>Listeria welshimeri</i>
31	<i>Listeria seeligeri/innocua/ivanovii</i>	67	<i>Listeria welshimeri</i>
31	<i>Listeria grayi</i>	71	<i>Listeria innocua</i>
31	<i>Listeria grayi / ivanovii</i>	71	<i>Listeria welshimeri</i>
31	<i>Listeria ivanovii</i>	71	<i>Listeria grayi</i>
31	<i>Listeria ivanovii</i>	71	<i>Listeria grayi</i>
32	<i>Listeria seeligeri / ivanovii</i>	73	<i>Listeria welshimeri</i>
32	<i>Listeria ivanovii</i>	73	<i>Listeria</i>
32	<i>Listeria ivanovii</i>	73	<i>Listeria welshimeri</i>
33	<i>Listeria seeligeri / ivanovii</i>	73	<i>Listeria grayi</i>
33	<i>Listeria seeligeri</i>	73	<i>Listeria grayi</i>
33	<i>Listeria welshimeri</i>	75	<i>Listeria innocua</i>
33	<i>Listeria ivanovii</i>	75	<i>Listeria innocua</i>
33	<i>Listeria ivanovii</i>	75	<i>Listeria welshimeri</i>
33	<i>Listeria ivanovii</i>	75	<i>Listeria grayi</i>
33	<i>Listeria ivanovii</i>	75	<i>Listeria grayi</i>
33	<i>Listeria ivanovii</i>	77	<i>Listeria welshimeri</i>
35	<i>Listeria grayi</i>	77	<i>Listeria welshimeri / innocua</i>
37	<i>Listeria welshimeri</i>	77	<i>Listeria welshimeri</i>
37	<i>Listeria ivanovii</i>	77	<i>Listeria grayi</i>

**Liste des profils numériques des listeria sur galerie Api**

**APPENDICE C**  
**LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS**

Cf	: Ce conférer
Ex.	: Exemple
F	: Fréquence
H	: Heure.
µm	Micron
ml	Millilitre
mm	Millimètre
µl	Microlitre
g	Gramme
°C	Degré Celsius
Mn	Minute
NaCl	Chlorure de sodium
MG-G	: coloration de May-Grunwald et Giemsa
spp	: <i>Species pluralis</i> : au singulier espèce est abrégé en « <i>sp.</i> » et sous-espèce en « <i>ssp.</i> »
Wilaya	: Département (Préfecture)