

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE SAAD DAHLAB- BLIDA
FACULTE DES SCIENCES DE NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE MASTER EN BIOLOGIE

OPTION

MICROBIOLOGIE ET TOXICOLOGIE ALIMENTAIRE

Thème

RECHERCHE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* DANS UN
PRODUIT LAITIER – FROMAGE A PATE PRESSEE NON
CUITE – DE TYPE « EDAM », AU NIVEAU DE LA
LAITERIE-FROMAGERIE DE BOUDOUAOU.

Réalisé par :

ALOUAT Sabrina

Date de soutenance : 09/10/2014

Devant le jury :

Mme BOULKOUR :.....Maitre assistante. A.....USDB.....Présidente.
Mme BOUDJEMAA:.....Maitre de conférences. B..... USDB.....Examinatrice.
Mr BOUKHATEM :.....Maitre de conférences. B.....USDB.....Examineur.
Mme ABDELLAOUI :.....Maitre assistante. A.....USDB..... Promotrice.

Promotion 2013-2014



REMERCIEMENTS

Je remercie Dieu le tout puissant qui m'a donné le courage et la patience pour accomplir ce travail

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

Je remercie en particulier :

- *Mme BOULKOUR qui ma fait l'honneur de présider ce jury et à qui j'adresse mes sincères gratitudees*
- *Mme BOUDJEMAA et Mr BOUKH ATEM pour l'examination de mon travail.*
- *Mme ABDELLAOUI.L, ma promotrice de m'avoir proposé ce thème et aussi pour son soutien, son aide, ses conseils, ses orientations et ses encouragements.*

Mes remerciements chaleureuses vont aussi à :

- *Louiza et Mme BOUAYAD.L pour leur disponibilité et leur aide, et à tout le personnel de l'ENSV.*
- *Au personnel du laboratoire de la laiterie-fromagerie de BOUDOUAOU*

Mes remerciements sincères s'adressent également aux enseignants qui ont contribué à ma formation.

Dédicaces

Avant tout, je me prosterne devant le tout puissant

*Allah de m'avoir guidé en si bonne voie vers le savoir et la lumière ;
de m'avoir donné la force, la santé et la volanté pour réaliser ce
modeste travail, que je dédie :*

*A ma famille qui m'a été d'un grand apport en me conseillant à
chaque fois que j'avais besoin d'elle surtout :*

*A la lune qui allume mes nuits, a celui qui était toujours présent
quand j'avais besoin de lui et ma inculqué les vrais valeurs de
l'homme : mon père.*

*Au soleil qui brille mes jours, a celle qui m'a appris mes premières
lettres d'alphabet : ma mère.*

Qui ont suent me mettre sur les rails pour avoir un but dans cette vie.

*Que ce travail soit le témoignage de ma profonde affection et ma
reconnaissance pour leur amour leur patience et leur soutient.*

*Qu'ils trouvent ici une infime représentation de ma gratitude et de ma
reconnaissance.*

A mes frères adorés : Raouf et Adel.

A toute la famille ALOUAT et BOUHAOUS.

*A mon très chère amie, sœur, collègue « Djazia » qui mérite le mot
« amie » qui a partagé avec moi tous les bons et les mauvais moments*

A mon cher fiancé : Adel et à toute la famille BEGHDAZI

A tous ceux qui sont chers a mon cœur.

Et toute ma promotion de Master 2 MTA 2013/2014

Sommaire

Introduction	1
Partie 1 : Partie Bibliographique	
Chapitre I : Généralités	3
I.1. Historique	3
I.2. Taxonomie	4
I.3. Ecologie microbienne	5
I.4. Caractères bactériologiques	5
I.4.1. Caractères microscopiques	5
I.4.2. Caractères culturaux	5
I.4.3. Caractères biochimiques	6
I.4.4. Caractères sérologiques	6
I.5. Physiologie de <i>Listeria</i>	7
I.5.1. La température	7
I.5.2. Le pH	7
I.5.3. Les sels	8
I.5.4. L'activité de l'eau aw	8
I.5.5. L'influence de l'inoculum	8
Chapitre II : Clinique de la Listériose	9
II.1. Pouvoir pathogène et virulence	9
II.1.1. Pouvoir pathogène	9
II.1.2. Physiologie de l'infection à <i>Listeria</i>	10
II.1.3. Dose infectieuse minimale	11
II.1.4. Antibiothérapie	11
Chapitre III : Les fromages	12

III.1.	Définition.....	12
III.2.	Fabrication du fromage	12
III.3.	Les différents types de fromages.....	13
III.4.	La fréquence de contamination des fromages par <i>L. monocytogenes</i>	14
 Partie II : Partie expérimentale.....		16
I.	Matériel.....	16
I.1.	Matériel de laboratoire.....	16
I.2.	Prélèvements.....	16
I.2.1.	Techniques de prélèvement et conditions de transport.....	17
I.2.2.	Préparation des échantillons.....	17
II.	Méthodes d'analyse	18
II.1.	Analyse qualitative.....	18
II.2.	Analyse quantitative	31
II.3.	Dénombrement des colonies caractéristiques.....	32
III.	Résultats et discussion.....	37
1.	Résultats des prélèvements positifs pour la présence de <i>Listeria</i>	37
2.	Résultats de l'identification biochimique des souches isolées.....	39
2.1.	Identification du genre.....	39
2.2.	Identification de l'espèce.....	40
2.2.1.	Par la galerie classique.....	40
2.2.2.	Par la galerie API <i>Listeria</i>	44
3.	Résultats du dénombrement.....	44
4.	Discussion des résultats de l'identification des espèces de <i>Listeria</i>	44

Conclusion	47
Recommandations.....	49
Référence bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
1	Evolution de la taxonomie des <i>Listeria</i> d'après BIND 1990.	04
2	Procès de fabrication du fromage EDAM (Laiterie-Fromagerie de BOUDOUAOU)	19
3	Aspect de <i>Listeria</i> sur gélose mobilité	24
4	Fiche de résultats de l'API	28
5	Résultats de la suspicion de présence de <i>Listeria spp</i> dans l'ensemble des prélèvements analysés.	38
6	Taux et répartition des 12 prélèvements suspectés être positifs selon les étapes d'où ils ont été prélevés.	39
7	Aspect des colonies de <i>Listeria</i> sur gélose Palcam	39
8	Aspect de la réaction de catalase	40
9	Aspect de <i>Listeria</i> sur gélose Mannitol mobilité à 25°C	40
10	Aspect des colonies <i>Listeria</i> sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures (1)	41
11	Aspect des colonies <i>Listeria</i> sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures (2)	43
12	Aspect des colonies <i>Listeria</i> sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures (3)	43

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
I	Caractères biochimique communs au genre <i>Listeria</i> .	6
II	Répartition des sérovars en fonction des espèces de <i>Listeria</i> .	7
III	Fréquence de contamination des fromages par <i>Listeria monocytogenes</i> .	15
IV	Répartition des prélèvements.	16
V	Lecture de la Galerie API <i>Listeria</i>	30
VI	Répartition des prélèvements sur les 03 productions	37
VII	Résultats de la suspicion de présence de <i>Listeria</i> dans l'ensemble des prélèvements analysés.	37
VIII	Répartition des prélèvements suspectés être positifs sur la chaîne de production	38
IX	Résultats de l'identification biochimique et de test d'hémolyse sur gélose au sang des souches isolées par la galerie classique.	42

Abréviations

ADN : Acide **D**éoxyribo **N**ucleïque

AFNOR : Association Française de **N**ormalisation

AFSSA : Agence Française de **S**écurité **S**anitaire des **A**iments

API: Analytic **P**rophylactic **I**ndex

ARN: Acide **R**ibo **N**ucleïque

A_w : Activité de l'eau

BGP: **B**acilles **G**ram **P**ostif

BPF : **B**onne **P**ratique de **F**abrication

DLC: **D**ate **L**imite de **C**onsommation

FDA: **F**ood and **D**rugs **A**dministration

FIL: **F**édération **I**nternationale de **L**aiterie

GC: Guanine Cytosine

HACCP: **H**azard **A**nalysis **C**ritical **C**ontrol **P**oint

ISO: **I**nternational for **S**tandardisation **O**rganisation

L: *Listeria*

LLO: La **L**isteriolisine **O**

NPP : **N**ombre le **P**lus **P**robable

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PALCAM : **P**olymixine **B**, **A**cridlavine, **L**ithium-chlorid, **C**eftazidine, **e**sculine, **D**-**M**anitol

RM: **R**ouge de **M**éthyl

SPP: Species Plurial

TDA : Tryptophane désaminase

TSA: Trypto-caséine soja

TSAYE: Tryptone Soja Agar Yeast Extract

TSI: Three Sugar Iron

UFC: Unité Formant Colonie

USDA: United States Drug Administration

VP : Voges Proskauer

Résumé

Le but de cette étude était d'établir la présence de *Listeria spp*, en particulier *Listeria monocytogenes* dans un produit laitier, fromage à pate pressée non cuite toute au long du procès de fabrication, en réalisant un isolement et une identification des souches *Listeria spp*, ainsi qu'un dénombrement pour voir l'évolution de la contamination.

Un total de 76 échantillons a été recueilli auprès de différentes étapes de 03 productions.

Sur les 76 échantillons analysés, 12 (15,79%) ont été présumés être des *Listeria spp*. 05 (6,79 %) ont été testés positifs pour *Listeria spp*, dont 03 (60 %) c'est des *L.innocua* et 02 (40 %) c'est des *L. ivanovii*.

Cette recherche ne nous a pas permis d'isoler *L.monocytogenes*, mais la présence de *L.innocua* parmi les colonies suspectes n'exclura pas la possibilité que *L.monocytogenes* soit présente, car il est reconnu et établi que *Listeria innocua* présente un taux de croissance plus rapide que *Listeria monocytogenes*.

La mauvaise qualité bactériologique du lait cru provenant de nos élevages, le non respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, une défaillance du traitement thermique pourraient expliquer cette contamination.

Mots clé : *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, fromage à pate pressée non cuite

Summary

The purpose of this study was to establish the presence of *Listeria spp*, particularly *Listeria monocytogenes* in a dairy product, cheese type pressed uncooked pasta throughout the entire manufacturing process, achieving isolation and identification of *Listeria spp* strains, as well as a count to see the evolution of the contamination.

A total of 76 samples were collected from 03 productions.

A total of 76 samples analyzed, 12 (15.79%) were presumed to be *Listeria spp*. 05 (6,79%) were tested positive for *Listeria spp*, including 03 (60%) and this is *L.innocua* of 02 (40%) is that of *L.ivanovii*.

This research did not allow us to isolate *L. monocytogenes*, but the presence of suspect colonies from *L.innocua* doesn't exclude the possibility that *L. monocytogenes* is present.

because it is recognized and established that *Listeria innocua* has a faster growth rate of *Listeria monocytogenes*.

The bad bacteriological quality of raw milk from our farms, non respect of good hygiene and manufacturing practices, a failure of the heat treatment could explain the contamination.

Keywords: *Listeria spp*, *Listeria monocytogenes*, cheese pressed uncooked pasta

ملخص

الغرض من هذه الدراسة هو تحديد وجود الليستيريا النيابة، لا سيما الليستيريا المستوحدة في منتجات الألبان، لجبن من نوع EDAM في جميع مراحل عملية التصنيع، تنفيذ العزل وتحديد سلالات الليستيريا النيابة، فضلا عن التعداد لمراقبة تطور التلوث. تم جمع 76 عينة من 03 انتاجات.

من 76 عينة تم تحليلها، 12 (15.79%) يفترض أن تكون الليستيريا النيابة، تم اختبار 05 (6,79%) ايجابية الليستيريا النيابة،

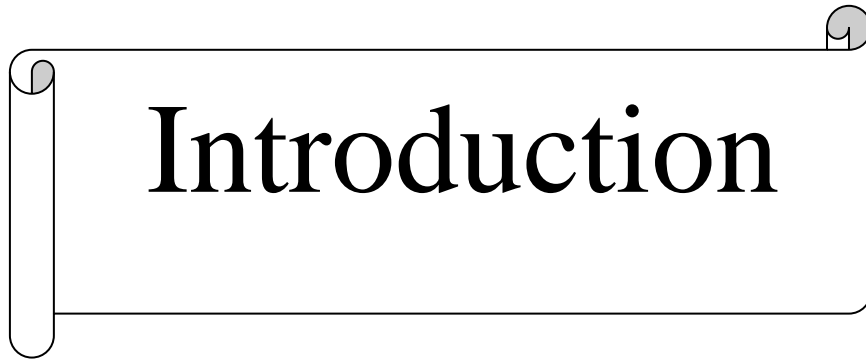
بما في ذلك 03 (60%) *L.innocua* و 02 (40%) *L. ivanovii*

هذا البحث لم يسمح لنا بعزل الليستيريا المستوحدة لكن وجود المستعمرات المشبوهة من *L.innocua* لا يستبعد إمكانية وجودها

لأن من المسلم به وثبت أن الليستيريا *innocua* لديه معدل نمو أسرع من الليستيريا المستوحدة

سوء النوعية البكتريولوجية للحليب الخام الات من مزارعنا، عدم الامتثال لممارسات التصنيع الجيدة والنظافة، وفشل المعالجة الحرارية يمكن أن يفسر هذا التلوث.

كلمات البحث: الليستيريا النيابة، الليستيريا المستوحدة، الجبن ذو العجينة المضغوطة غير المطهية



Introduction

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

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

Mais est ce que vraiment les laboratoires d'autocontrôles des unités de production, respectent cette obligation et font la recherche de ce type de bactérie, afin d'assurer la sécurité des produits alimentaires qu'ils fabriquent et préserver la santé du consommateur algérien ?

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

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à la recherche, l'identification et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* dans un produit laitier – Fromage à pâte pressée non cuite – de type EDAM, boule de 1 kg, toute au long de sa chaîne de production, pour voir l'évolution de la contamination en s'appuyant sur une méthode de référence normalisée et validée par ISO.

Notre travail s'articulera en 3 parties :

- Dans un premier temps : une partie bibliographique dans laquelle seront développés :

-1-

- ✓ Des généralités sur la *Listeria*, la maladie causée par ce genre de bactérie, denrées alimentaires liées à la *Listeria*, généralités sur les fromages et les techniques de recherche des *Listeria*.

- Dans un deuxième temps nous présenterons la partie expérimentale qui regroupera :
 - ✓ L'échantillonnage
 - ✓ Méthodes de recherche et de dénombrement

- Nous présenterons après la partie expérimentale les résultats obtenus et on discutera ces dernières.

- On clôturera notre travail par une conclusion et des recommandations.



Partie I :

Partie

Bibliographique

Chapitre I : Généralités

I-1. Historique :

En Algérie :

-En 1967, Benallegue et *al* isolèrent pour la première fois la bactérie lors d'un cas de méningite (**Lebres, 2002**)

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

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

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

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

I-2. Taxonomie :

Dans l'édition du Bergey 's Manuel of Systematic Bacteriology de 1986, le genre *Listeria* fait partie des bacilles Gram positif réguliers. A cette époque, le genre *Listeria* comprenait 8 espèces : *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi* et *Listeria denitrificans* (Figure n°1) (**Larpent ,2004**).

D'après **Rocourt (1996)** rapporté par **Larpent (2004)** le genre *Listeria* se définit sur le plan de la taxonomie par :

-Présence d'acide lipotéichoïque et absence d'acide mycolique.

-Un faible pourcentage de G+C (37-41 et 37 -39 % pour *L. monocytogenes*).

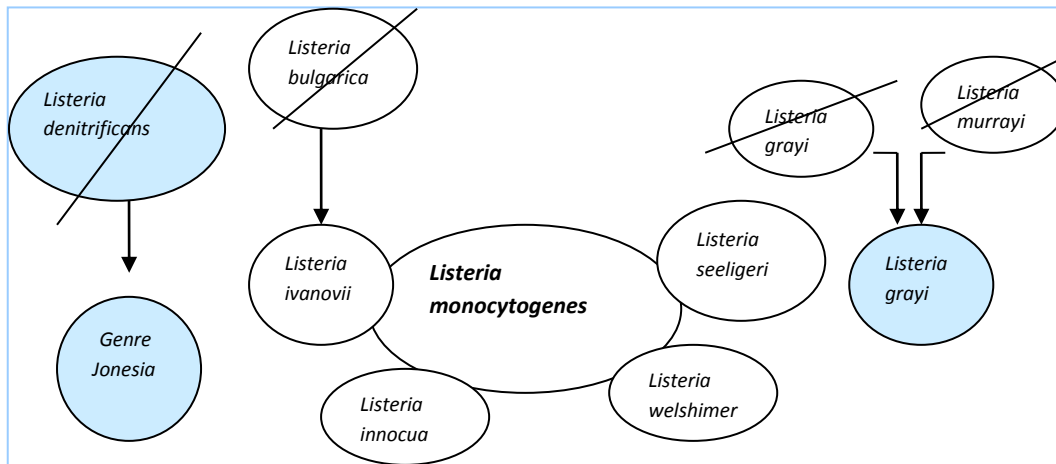


Figure n°1: Evolution de la taxonomie des *Listeria* d'après BIND en 1990 (Larpent, 2004)

Classification phylogénique des *Listeria* selon DELARRAS (2007) :

- Domaine** : Bacteria
- Phylum** : Firmicutes
- Classe** : Bacilli
- Ordre** : Bacillales
- Famille** : Listeriaceae
- Genre** : *Listeria*

I-3. Ecologie microbienne :

Listeria est une bactérie mésophile, hydrotellurique et ubiquitaire que l'on retrouve aussi bien chez les porteurs sains, qu'au niveau du milieu extérieur : sol, terre, végétation, ensilage et eau

Listeria en particulier *Listeria monocytogenes* peut profiter des matières organiques en décomposition, se comportant alors en germe saprophyte, ou peut constituer des biofilms sur des surfaces. Cette capacité de survie et d'implantation multiplie les modalités de contamination des denrées alimentaires et d'exposition des animaux et de l'homme (Federighi, 2005)

Cette bactérie peut survivre dans le tube digestif des animaux et de l'homme. Tous les individus contaminés par *Listeria*, qu'ils soient porteurs sains ou malades sont susceptibles d'excréter le germe dans l'environnement et d'enrichir le milieu. (Federighi, 2005 et Portulier, 2002)

I-4. Caractères bactériologiques :

I-4-1. Caractères microscopique :

En microscopie optique, les bactéries de genre *Listeria* apparaissent sous la forme de bactéries isolées, associés en V ou formant des associations de cellules parallèles et parfois en courtes chaînes, quelques cellules pouvant être incurvées, de 0,4 à 0,5µm de diamètre (**Larpen, 2004**)

Elles sont non capsulées et ne forment pas de spores. Elles sont mobiles à 20-25°C au moyen de 5 à 6 flagelles péritriches et peu mobiles ou immobiles à 37°C (**Sutra et al., 1998**). Cette mobilité se traduit par une image caractéristique en parapluie sur gélose molle ensemencé par piqûre centrale et incubée à 20°C (**Portelier, 2002**)

I-4-2. Caractères cultureux :

Les *Listeria* sont aéro-anaérobie facultatifs, des atmosphères à tension légèrement abaissée en O₂ et augmentée en CO₂ par rapport à celle de l'air donnent des cultures plus abondantes.

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

Le genre *Listeria* n'est pas un genre exigeant, il se développe sur tous les milieux usuels en 24-48 h. Sur gélose nutritive, les *Listeria* forment des colonies de faible diamètre (<1.5 mm), lisses, transparentes, légèrement convexes et à bords réguliers. Eclairées par une lumière oblique, les colonies ont une légère coloration bleu vert.

Le pH optimal est neutre ou légèrement alcalin, mais la croissance est obtenue pour un large éventail de pH (5-9.6) (**Delarras, 2007**).

Les *Listeria* présentent une certaine halotolérance et toutes les souches se cultivent en présence de 10 % de NaCl dont certaines tolèrent même des concentrations en sel de 20 % (**Larpen, 2004**).

Sur gélose au sang de cheval ou de mouton, après 24-48 h d'incubation, l'activité hémolytique est due à la sécrétion des toxines dites hémolytiques responsable de la lyse des érythrocytes

produits pour les espèces *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* et *Listeria seeligeri*. On observe un halo incolore, transparent qui se forme autour de la colonie (β -hémolyse) (Sutra et al.,1998).

I-4-3. Caractères biochimiques :

Toutes les espèces de *Listeria* sont catalase positive, oxydase négative, produisent des acides mixtes (RM+) et de l'acétoïne (VP+) à partir du glucose sans production d'hydrogène ni de gaz sulfureux ; elles hydrolysent rapidement l'esculine et l'hippurate1 à l'exception de *Listeria grayi* (Larpent, 2004).

Les principaux caractères communs des espèces du genre *Listéria* sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau I : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria*. (Larpent ,2004).

Réactions positives	Réactions négatives
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Catalase ▪ Glucose, fructose, mannose, amygladine salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol ▪ VP, RM ▪ Esculine ▪ Type respiratoire : aéro-anaérobie. ▪ Réduction du lait tournesolé ▪ Mobilité 22°C 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Oxydase ▪ Gaz en glucose ▪ Uréase ▪ Indole ▪ Gélatinase ▪ H₂S

L'identification des différentes espèces est fondée sur les caractères suivants :

- Hémolyse sur gélose au sang.
 - Le CAMP test avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*.
- Production d'acide à partir du xylose, du ribose, du rhamnose, de l'alpha méthyl-D-mannoside et du mannitol (Larpent, 2004) (annexe I).

I-4-4. Caractères sérologiques :

Au sein du genre *Listeria*, on définit des sérovars sur la base de deux types d'antigènes :

- 15 antigènes somatiques O thermostable désignés de I à XV.

- 5 antigènes flagellaire H thermolabile désignés de A à E (Sutra et al. ,1998 et Larpent, 2004).

Il existe 17 sérovars du genre *Listeria*, chaque sérovar correspond à la combinaison de plusieurs antigènes O et d'un ou plusieurs antigènes H.

Dans les cas d'infection humaine les Sérovars les plus fréquents sont : 4b (49 %), 1/2 à (26 %) et 1/2 (19%) (Larpent, 2004).

Tableau II : Répartition des sérovars en fonction des espèces de *Listeria* (Larpent, 2004)

Espèce	Sérovars
<i>L.monocytogenes</i>	1/2a,1/2b, 3a, 3b,4a,4ab,4b,4c,4d,4e,7
<i>L.innocua</i>	3,6a,6b,4ab
<i>L.ivanovii</i>	5
<i>L.seeligeri</i>	1/2a,1/2b,1/2c,4b,4c,4d,6b
<i>L.welshimeri</i>	1/2a,4c,6a,6b

I-5. Physiologie de *Listeria* :

Les principaux paramètres d'environnement et de milieu qui vont conditionner la multiplication des *Listeria* et seront donc à même d'être utilisés afin d'inhiber la croissance de cette bactérie sont : La température, le pH, les sels, l'activité de l'eau et l'influence de l'inoculum. (Nicklaus, 2001).

I-5-1. La Température :

Les *Listeria* ont la possibilité de se développer dans une gamme donnée de température caractérisée par une limite supérieure, au-delà de laquelle la mort survient. Cette vaste gamme de température de développement ainsi que l'optimum compris entre 30°C et 37°C font de *Listeria* un germe mésophile et psychrotrophe.

Le germe n'est pas détruit à des températures inférieures à +1°C ou supérieure à 45°C (Nicklaus, 2001).

I-5-2. Le pH :

Le Bergy's manuel considère que *Listeria monocytogenes* peut se développer de pH=5,6 à pH=9,6. Cependant, bien que *Listeria monocytogenes* soit plus tolérante aux pH alcalins qu'aux pH acides, certains travaux tendent à démontrer que le pH inférieur de développement soit plus bas que les 5,6 annoncés (**Nicklaus, 2001**)

I-5-3. Les Sels :

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

I-5-4. L'Activité de l'eau : aw

Listeria se développe à un optimum d'aw = 0,97 mais peut se développer à 0,943. (**Larpen, 2004**)

I-5-5. L'Influence de l'inoculum :

Le temps de latence de *Listeria monocytogenes* est prolongé lorsque l'inoculum est faible ou soumis à des conditions sub-optimales (milieux pauvres, pH =6 et 6.5)

Avec des volumes plus faibles d'inoculum le temps de latence et la variabilité entre échantillons sont modifiés

Le nombre de cellules nécessaires pour obtenir une croissance augmente en présence de concentrations inhibitrices en NaCl. Il dépend de la présence d'une fraction résistante de la population.

La probabilité de croissance diminue rapidement lorsque les conditions deviennent extrêmes. Le besoin critique d'un volume d'inoculum important est dû à la mort d'une proportion donnée de cellules plutôt qu'à un effet de non coopération (**Larpen, 2004**).

Chapitre II : Clinique de la Listériose

II-1. Pouvoir pathogène et virulence :

II-1-1. Pouvoir pathogène :

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

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

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

a. La listériose materno-infantile :

➤ **Chez la femme enceinte :**

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

➤ **Chez le nouveau-né :**

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

Quelques heures après la naissance on observe le plus souvent des septicémies, hépatosplénomégalie, ictère et éruption (granulomatose septique infantile), associée dans 2/3 des cas à une méningite (**Singleton, 1999 et Larpent, 2004**).

b. La listériose de l'adulte :

Les *Listeria* sont surtout virulentes chez des personnes à risques : personnes âgées, cancéreux, greffés, immunodéprimés. La sensibilité à *Listeria monocytogenes* est augmentée

par le diabète, les maladies hépatiques ou rénales, la diminution gastrique, la dépendance aux narcotiques et au tabac. Les surcharges en fer favorisent également la maladie **(Larpen, 2004)**

Chez l'adulte, 30- 50 % présentent une listériose méningique .D'autres atteintes du système nerveux central sont décrites, comme les méningo-encéphalites et les abcès du tronc cérébral et de la moelle osseuse **(Avril et al., 2002; Bourgeois et al., 1996 et Larpen, 2004)**

Chez les animaux : La listériose est très fréquente et touche tous les genres et les espèces. Les infections sont très proches de ceux observés chez l'homme (septicémie, méningo-encéphalites et avortement) **(Larpen, 2004)**

I1-1-2. Physiopathologie de l'infection à *Listeria* :

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

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

Chez l'homme, la voie de pénétration de cette bactérie est localisée aux voies aériennes supérieures (angines, pharyngites, infections pseudo grippales) et aussi au niveau du tube digestif après absorption d'aliments contaminés. **(Larpen, 2004).**

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

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

- ✚ **L'internalisation :** *Listeria monocytogenes* produit des internalines qui sont indispensables à l'invasion cellulaire, les *listeria* adhèrent à des cellules non phagocytaires (entérocytes, hépatocytes, fibroblastes, cellules épithéliales) puis pénètrent en induisant leur propre phagocytose.
- ✚ **Sortie de la vacuole intracellulaire :** les bactéries internalisées quittent la vacuole de phagocytose pour gagner le cytoplasme. La listériolysine O (LLO) : exotoxine codée par le gène *hly*, intervient lors de la lyse de la vacuole ; elle est responsable du pouvoir hémolytique observé in vitro sur gélose au sang de mouton
- ✚ **Nucléation des filaments d'actine :** l'actine A produite par *Listeria* a permis le contact avec les filaments d'actine de la cellule hôte, de rejoindre la membrane plasmique et de former une évagination de cette membrane qui sera phagocytée par la cellule voisine.

Propagation aux cellules voisines : une phospholipase et une lécithinase favorisent la propagation aux cellules voisines (Moll et Moll, 2002; Larpent, 2004 et Federighi, 2005)

II-1-3. Dose infectieuse minimale :

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

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

II-1-4. Antibiothérapie :

L'antibiothérapie se compose d'un traitement symptomatique qui corrigera les perturbations des différentes fonctions ainsi que d'une antibiothérapie qui doit être instaurée rapidement. *Listeria* est sensible à de nombreux antibiotiques. Sa sensibilité est restée stable dans le temps, l'ampicilline et la pénicilline apparaissent comme les meilleurs médicaments pour traiter la listériose, l'érythromycine a été avancée comme antibiotique de second choix. (Lebres, 2006)



Chapitre III : Les fromages

III-1. Définition :

Le fromage est un produit laitier, obtenu à partir de la coagulation du lait un ensemble d'enzymes coagulants, connu sous le nom de présure, suivie de l'élimination partielle du lactosérum (égouttage), ce qui laisse subsister un caillé, lequel est à l'origine du fromage.

C'est un aliment riche en calcium fabriqué à partir de lait de vache principalement mais aussi de brebis, de chèvre, de bufflonne. Le mot fromage vient du latin « formaticus » signifiant qu'il est fabriqué dans une forme, appelée moule de fromage (**Eck et Gillis, 1997**).

III-2. Fabrication :

La transformation du lait en fromage comporte en général trois étapes :

- **La coagulation** : modification physicochimique des micelles de caséine sous l'action d'enzymes protéolytiques et (ou) d'acide lactique.
Elles entraînent la formation d'un réseau protéique tridimensionnel appelé coagulum ou gel ;
- **L'égouttage** : séparation d'une partie du lactosérum, après rupture mécanique du coagulum, par moulage et dans certains cas, pression ; il conduit à l'obtention du caillé ;
- **L'affinage** : transformation biochimique des constituants du caillé sous l'action d'enzymes, pour la plupart d'origine microbienne.

Dans la plupart des fabrications, entre la 2^e et la 3^e étape, se situe l'opération de salage qui représente à la fois un complément d'égouttage et un facteur important de la maîtrise de l'affinage par réglage de l'activité de l'eau.

Selon les paramètres technologiques mis en œuvre au niveau de ces trois étapes, on peut obtenir une très grande variété de fromage. La texture, la saveur et l'arôme du produit sont étroitement liés à la composition (teneurs en eau, protéines, matières grasses, minéraux) et au pH du caillé ainsi qu'aux conditions d'affinage ; les caractéristiques du caillé dépendent elles-mêmes de celles du coagulum mais aussi de la nature et de l'intensité du travail mécanique,

du pH auquel il est effectué et de la vitesse d'égouttage ; les propriétés rhéologiques du gel varient selon les conditions de la coagulation (la quantité d'enzymes coagulantes, le pH, la température, la vitesse d'acidification) et les caractéristiques originelle du lait.

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

III-3. Les différents types de fromages :

L'élément principal qui permet de classifier les fromages est leur croûte :

Les pâtes molles : Outre la fermentation lactique, ces fromages font l'objet de fermentations complémentaires. Leurs pâte n'a pas été cuite, ni pressée.

- Les pâtes molles à croûte fleurie : Appartiennent à cette catégorie : les Bries, les Camemberts, les Neufchâtels, les Coulommiers... Ils se caractérisent par une pâte duvetée de blanc, où affleurent des pigments rougeâtres (Penicillium).
- Les pâtes molles à croûtes lavées : Appartiennent à cette catégorie : Pont l'Evêque, Munster, Maroilles, Vacherin, ... Ces fromages à la différence des précédents sont régulièrement lavés à l'eau salée. Cela évite le développement de moisissures, et favorise la fermentation, d'où leur goût plus fort... Ils ont alors une couleur virant plus vers le jaune, voire le rouge.

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

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

- La pâte pressée non cuite : ils sont obtenus par égouttage sous presse, de fromage à caillé divisé, non réchauffé. Les tomates de Savoie, Sait Nectaire, Reblochon, sont considérées comme des pâtes pressées.

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

Les pâtes fondues : Ce sont généralement des fromages industriels, obtenus par la cuisson de fromages auquel on ajoute des produits laitiers (lait, crème fraîche, beurre...).

Les pâtes fraîches :

Si lors de la fabrication du fromage il n'y a pas maturation, on parle de fromage frais. Le fromage frais est égoutté dans un linge. Parfois, il est ensuite malaxé ou raffiné. Le goût acide s'explique par la présence d'acides lactiques non fermentés. Il existe cependant aussi des fromages frais qui ne sont pas du type acide.

Il existe quatre types de fromage frais :

- Le fromage maigre (moins de 20 % de graisses) ;
- Le fromage mi-gras (plus de 20 % et moins de 35 % de graisses) ;
- Le fromage gras (plus de 35 % de graisses) ;
- Le fromage crème (au moins 45% de graisses).

La teneur en graisses des fromages frais est déterminée par le lait qui a été utilisé pour leur fabrication. Ils peuvent être préparés à partir de lait de vache, chèvre, brebis ou de leur mélange. Le lait peut être totalement ou partiellement écrémé, entier ou enrichi de crème. La conservation du fromage frais se fait au réfrigérateur et de préférence dans l'emballage original. (Eck et Gillis, 1997)

III-4. La fréquence de contamination des fromages par L.monocytogenes :

Depuis les épidémies de Californie et de suisse, de nombreuses publications font état de la fréquence de contamination des fromages par L.monocytogenes. L.monocytogenes peut être isolée de fromage à pâte molle ou semi-molle, à pâte persillée, à pâte pressée ou à pâte fraîche. Prés de 75 % des fromages positifs pour L.monocytogene, fabriqués à partir de lait pasteurisé ou cru, ont un taux de contamination compris entre 1 et 100 UFC/g, mais certains fromages contiennent jusqu'à 10⁸/g. La fréquence de la contamination varie de 1 % à 2 % (Tableau III)

Tableau III : Fréquence de contamination des fromages par *Listeria monocytogenes* (Larpent ; 2000)

N b de fromages analysés	420	69	20	140	374	706	43	216	222	4	323	509	1740	121
% de fromages positifs	30	09	10	<1	02	03	09	06	10	25	<1	12	4	2

Cette statistique diffère de celle obtenue par **SKOVGAARD et al (1986, 1988,1989)** et **TERPLAN et al (1987, 1989, 1990)** qui enregistrent 25 % et 30 % de contamination pour des fromages à pâte molle ou semi-molle.

Cette contamination peut être limitée à la croûte ou comprendre également la pâte. Dans certains cas, le taux de contamination, particulièrement important, est évalué à 7.10^5 *Listeria/g* de croûte.

Pour les fromages, le taux de contamination se situe entre 20 et 10^4 colonies/g. Il est possible de dénombrer dans quelques fromages jusqu'à 10^5 UFC/g. Exceptionnellement, un fromage contenait 3.10^6 UFC de *Listeria/g*. A partir des laits de mélange, les résultats font en général état d'un taux de contamination inférieur à 100 UFC/ml. Sur ce lait 59 % des échantillons étaient exempts de *Listeria*, les fromages étaient négatifs dans 55 % des cas.

Listeria survit 30 minutes à pH 4,6. Les températures de chauffage, 30 minutes à 57,2 °C, diminuent les populations par 4 dans le caillé du (Cottage cheese). Dans le caillé de Mozzarella (pH 5,2), les *Listeria* sont inactivées après 3-4 minutes de filage à 58-65°C. Les populations restent ensuite constante ou diminuent de 5 fois durant les étapes suivantes de la fabrication (délactosage, salage, pressage).

Trois échantillons de « Cottage cheese » inoculés avec *Listeria monocytogenes* sont stockés à 4°C, 8°C ou 12°C pendant 14 jours.

Dans ces conditions on observe une diminution du nombre de *Listeria*. La diminution la moins importante est obtenue pour les produits aux pH les plus élevés et aux teneurs en acide lactique les plus faibles (**Larpent ; 2000**).



Partie II :

Partie

Expérimentale

Objectif :

Notre étude porte sur la recherche, l'isolement et l'identification des souches *Listeria spp* dans un fromage de type EDAM « Fromage à pâte pressée non cuite », boule de 1 kg, toute au long du procès de fabrication à partir du lait de vache cru jusqu'au produit fini et sur le dénombrement des souches isolées qui renseigne sur l'évolution de la contamination.

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

Il s'agit des équipements d'un laboratoire de microbiologie alimentaire. Les milieux de culture, les réactifs, les suppléments utilisés et leurs formules sont rapportés en annexes III

I-2. Prélèvements :

Le matériel biologique est représenté par des échantillons prélevés aseptiquement sur 03 productions successives du fromage type EDAM 1 kg.

Tableau IV : Répartition des prélèvements

Nature du prélèvement	Nombre de prélèvement
Lait de vache cru	42
Lait de mélange « Tank » (Avant pasteurisation)	04
Lait de mélange (Après pasteurisation)	03
Avant maturation	03
Après maturation	03
Après coagulation	03
Après Découpage et Brossage	03
Moulage	03
Avant saumurage	03
Après saumurage	03
Affinage	03
Produit fini	03
Total	76

I-2-1. Techniques de prélèvement et conditions de transport :

Les prélèvements ont été réalisés dans les meilleures conditions d'asepsie.

Les échantillons liquides (Lait de vache aux différentes étapes du procès) ont été collectés dans des flacons stériles de 250 ml, les échantillons solides ont été introduits dans des sacs stériles.

Les échantillons ont été acheminés vers le laboratoire d'analyse tout en respectant la chaîne du froid (transport dans des glacières).

I-2-2. Préparation des échantillons :

Pour échantillons solides, les sacs contenant 25g d'aliment sont additionnés chacun 225 ml du bouillon Fraser ½ et sont homogénéisés à l'aide d'un STOMACHER. On obtient une solution mère au un dixième.

Pour les échantillons liquides, introduire aseptiquement à l'aide d'une pipette graduer, 25ml de lait dans 225 ml de Fraser au demi.

L'étude pratique, a été réalisée au niveau du laboratoire d'HIDAOA (Hygiène des Denrées Alimentaires d'Origine Animale) à l'ENSV (Ecole Nationale Supérieure Vétérinaire)

L'échantillonnage, a été réalisé au niveau de la « laiterie fromagerie » de BOUDOUAOU (LFB).

II. Méthodes d'analyse :

II-1. Analyse qualitative : Méthode ISO 11290-1. Recherche des Listeria à partir des denrées alimentaires

Objet et domaines d'application :

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

a. Echantillonnage :

La répartition des échantillons est comme suite :

Collecteurs → **Lait de vache crû** ← Echantillonnage

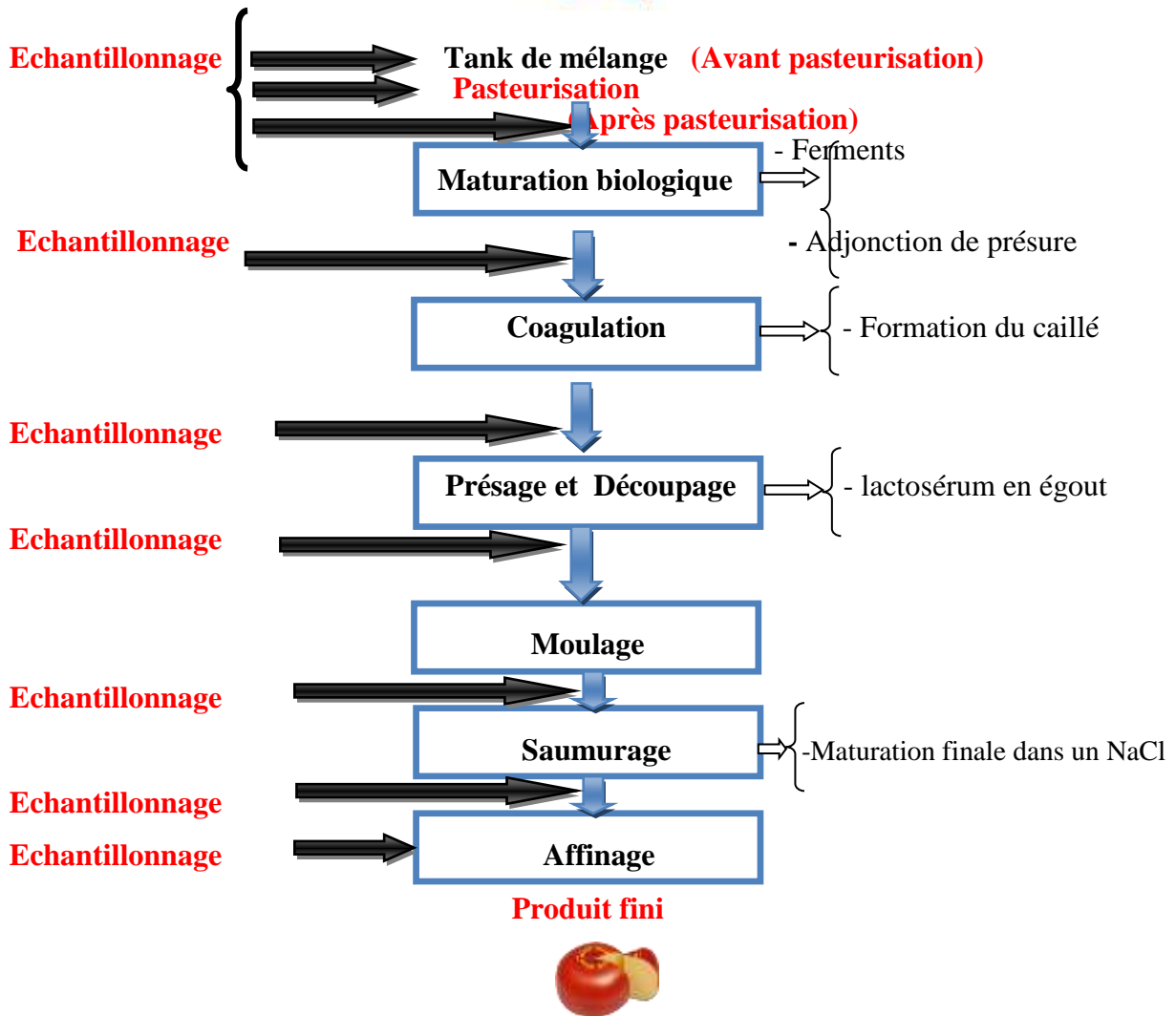


Figure n°2 : Procès de fabrication du fromage EDAM

(Laiterie Fromagerie de BOUDOUAOU)

b. Mode opératoire :

Pour préparer la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu du bouillon Fraser au demi.

Par cette méthode, la recherche des listeria se fait selon le protocole suivant :

1- Enrichissement primaire :

Ajouter 225 ml de milieu bouillon Fraser au demi (milieu d'enrichissement primaire) dans le sachet de type stomacher contenant 25 g de fromage ou 25 ml de lait de vache cru de façon à obtenir un rapport prise d'essai/milieu d'enrichissement de 1/10.

Sans addition d'agents sélectifs. On broie cette suspension dans un broyeur de type stomacher, puis on la met dans un flacon stérile qu'on incube à 30°C pendant 18 à 24 heures.

2- Enrichissement secondaire et premier isolement :

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

- D'une part, à l'enrichissement secondaire sur milieu sélectif de fraser en tube de 10 ml à raison de 0,1 ml, à incuber pendant 48 h ± 2 h à 35°C ou 37°C.
- D'autre part, à l'isolement sur gélose Palcam (P1) et Oxford (O1), à incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures, comme l'indique le schéma n°2 ci-après.

3- Lecture du premier isolement et isolement secondaire :

- A partir du bouillon d'enrichissement secondaire, procéder au deuxième isolement sur gélose Palcam (P2) et Oxford (O2), à incuber à 37°C pendant 24 à 48 heures.
- Faire la lecture des boîtes P1 et O1, en recherchant les colonies caractéristiques présumés être des *Listeria spp*
- Dans le cas de forte suspicion, procéder à une purification sur gélose TSAYE.
- Dans le cas contraire, ré-incuber les boîtes pendant 24 heures supplémentaires.

4- Lecture:**Gélose Oxford :**

Après 24 h d'incubation les colonies typiques de *Listeria spp*, sont de petites colonies (1 mm) de couleur grisâtre entourées d'un halo noir

Après 48h, les colonies deviennent plus foncées avec éventuellement des reflets verdâtres, présentent un diamètre d'environ 2 mm, sont entourées d'un halo noir et présentent une dépression centrale.

Gélose Palcam :

Après 24 h, les *Listeria spp*, se présentent sous forme de petites ou très petites colonies vertes avec des reflets grisâtres, ou vert olive, de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec parfois un centre noir mais toujours entourées d'un halo noir. Après 48 h, les *Listeria spp*, se présentent sous forme de colonies vertes de 1,5 mm à 2 mm de diamètre, avec une dépression centrale, et entourées d'un halo noir.

Gélose TSAYE :

Les colonies typiques, de 1 mm à 2 mm de diamètre, sont convexe, incolore, translucides à bords réguliers.

5. Identification biochimique :

Les colonies caractéristiques ayant poussé sur gélose Palcam, Oxford et Tsaye feront l'objet d'une identification biochimique basée sur :

- **Identification du genre *Listeria*, elle-même basée sur :**
 - Coloration de Gram (petits BGP),
 - Test Catalase (positif),
- **Identification des espèces du genre *Listeria*, basée elle-même sur :**
 - Mobilité (sur gélose mobilité à 22 – 25°C),
 - Hémolyse de type β , ou Camp-test sur gélose TSA au sang,
 - Aero-anaérobie facultatif,
 - VP (+) et RM (+),
 - Oxydase (-),
 - Nitrate réductase (-),
 - Glucose (+), Gaz (-) et H₂S (-),
 - Esculine (+),
 - Urée (-), Indole (-) et TDA (-),- Ou mieux encore une galerie biochimique miniature de type API-*Listeria*

1. Confirmation du genre *Listeria* :

1-1. Etude morphologique et sélection des colonies pour la confirmation:

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

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

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

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

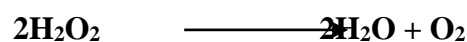
- Placer les boîtes dans l'étuve réglée à 35°C ou 37°C pendant 18 h à 24 h ou jusqu'à un développement satisfaisant.

* **Les colonies typiques**, de 1 mm à 2 mm de diamètre, sont **convexe, incolores, translucides**, à bords réguliers.

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

1-2. Réaction Catalase :

La catalase est un enzyme qui empêche l'accumulation d'H₂O₂, dont l'action serait létale pour la cellule bactérienne, catalysant la réaction suivante :



L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse

Mode opératoire :

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

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

Observer immédiatement et après 5 minutes s'il 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.

1-3. Observation microscopique :

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

Mode opératoire :

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

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

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

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

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

Sécher la lame au buvard (papier Joseph), observer au microscope photonique à l'objectif G×40 avec addition de l'huile à immersion.

C'est des petits bacilles à Gram positifs, en forme de « V » ou de « L ».

2. Confirmation de l'espèce du genre *Listeria* :

2-1. Galerie classique :

2-1-1. Mobilité :

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

Les *Listeria* sont mobiles à 25°C et présentent un aspect de croissance typique en parapluie sous la surface de la gélose (Figure n°3) .

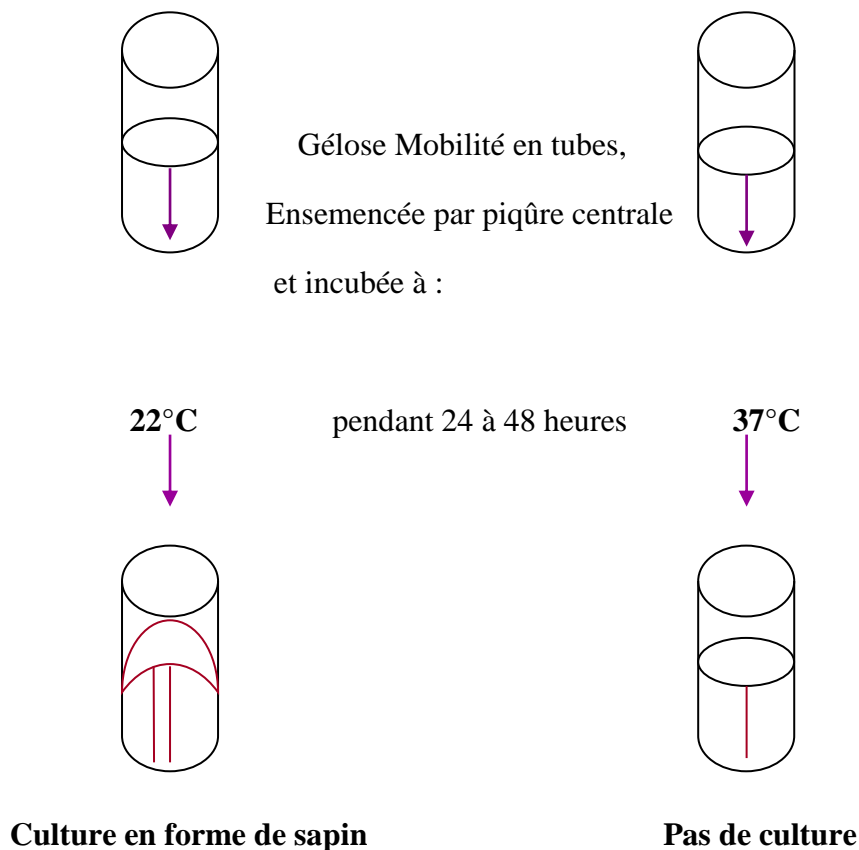


Figure n°3 : Aspect de *Listeria* sur gélose mobilité

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

2-1-2. Recherche de l'hémolyse :

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

2-1-3. Galerie classique :

Les tests effectués pour cette galerie sont les suivants :

- TSI,
- VP et RM,
- Oxydase,
- Hydrolyse de l'esculine,
- Urée-indole,

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

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

a- Ensemencement sur milieu TSI :

Ce milieu permet la détection de cinq caractères :

- Fermentation des sucres : glucose, saccharose, lactose.
- Production de gaz.
- Formation de H₂S.

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

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

Lecture :

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

Culot rouge : Glucose (-).

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

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

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

- Formation d'H₂S : se traduit par un noircissement de la ligne joignant le culot et la pente.

b- Voges Proskauer (VP) et rouge de méthyle (RM)

La lecture sur milieu Clarck et Lubs servira à la détermination des deux tests.

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

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

Lecture :

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

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

Lecture :

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

- Si le pH est inférieur à 5 : il y a eu une forte acidification, le test est dit positif (coloration rouge). Les bactéries à RM positif produisent des acides organiques par voie des acides mixtes.

c- Le test de l'oxydase :

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

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

Lecture :

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

d- hydrolyse de l'esculine :

L'hydrolyse de l'esculine est testée en ensemençant la gélose Esculine par piqûre centrale. Après 24 h d'incubation à 37°C l'hydrolyse de l'esculine se traduit par un noircissement de milieu.

e- Recherche de tryptophane désaminase, indole et urée :

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

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

Lecture :

Si le milieu vire au rouge violacé, la réaction est positive donc la bactérie a hydrolysé l'urée.

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

- Prendre le premier tube et ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs.

S'il y a formation d'un anneau rouge à la surface, la réaction est positive.

- Prendre le deuxième tube et ajouter quelques gouttes de réactif TDA.

S'il y a virage de la couleur au marron foncé, la réaction est positive.

(Dans le cas où le test est uréase positif, ramener le milieu au pH initial par l'ajoute de quelque goûtes de HCl).

2-1-4. Galerie API Listeria: (Analytic Prophylactic Index) :

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

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

a. Principe :

La galerie API *Listeria* comporte 10 microtubes ou cupules de substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques ou des fermentations des sucres et qui sont disposés de la façon dont l'indique la figure n°4

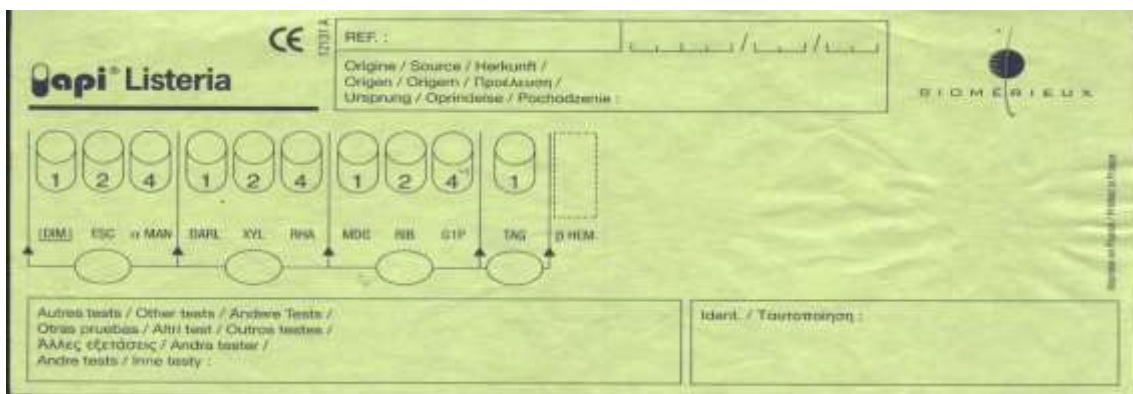


Figure n°4 : Fiche de résultats de l'API

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

DIM : Permet la différenciation entre *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*.

ESC : hydrolyse de l'Esculine.

MAN : Mannose.

DARL: D-Arabitol (Test d'acidification).

XYL: D-Xylose (Test d'acidification).

RHA: Rhamnose (Test d'acidification)

MDG: Methyl-D-Glycoside (Test d'acidification)

RIB: Ribose (Test d'acidification)

GIP: Glucose 1 phosphate.

TAG: D-Tagatose.

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

b. Mode opératoire :

- Vérifier l'appartenance de la souche a étudié au genre *Listeria* (courtes bacilles a Gram positif, catalase positive et oxydase négative). Il est préférable de réaliser une culture sur gélose au sang à partir d'une colonie bien isolée.
- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 3ml d'eau distillée dans les alvéoles de fond pour créer une atmosphère humide.
- Ouvrir une ampoule d'API suspension medium, à l'aide d'une pipette prélever quelques colonies bien isolées. Réaliser une suspension laiteuse d'opacité égale a 1 de Mc Fariand.
- Répartir la suspension bactérienne précédente dans les cupules en évitant la formation des bulles (pour cela incliner la boîte d'incubation vers l'avant et placer la pointe de la pipette sur le coté de la cupule).
- Remplir le test DIM environ 100µl, soit deux gouttes, en veillant à ne pas créer un ménisque convexe.
- En ce qui concerne les autres tests ESC à TAG, remplir uniquement la partie basse ; soit 50µL.
- Refermer la boîte d'incubation.
- Incuber 24 h à 37 °C.

Remarque: La qualité du remplissage est très importante : des cupules insuffisamment ou trop remplies sont source de résultats faussement positifs ou négatifs.

Noter également le type d'hémolyse .Les résultats de ce test n'est pas pris en compte dans l'interprétation de la galerie

c. Lecture de la Galerie :

- Après 24h d'incubation, ajouter une goutte de réactif ZYM B au test DIM.

- Lire dans les trois minutes toutes les réactions on se référant au tableau V.

- Noter ensuite les réactions positives par signe (+) et les réactions négatives par le signe (-) sur la fiche des résultats.
- 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 et 4 est indiquée pour chacun comme l'indique la figure n°7

- En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, un profil de 4 chiffres est obtenu, exemple : 6510.

- L'identification de l'espèce *Listeria* est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste proposé par API *Listeria* (annexe IV)

Tableau V : Lecture de la Galerie API Listeria

Tests	Réactions	Résultats	
		Négatifs	Positifs
DIM	Différenciation <i>Listeria innocua / Listeria monocytogenes</i>	Orange pale Rose beige Gris bleu	Orange
ESC	Esculine (hydrolyse)	Jaune pale	Noir
αMAN	& Manosidase	Incolore	Jaune
DARL	D -Arabitol (Acidification)	Incolore	Jaune
XYL	D- Xylose (Acidification)	Rouge, Rouge - Orangé	Jaune, Jaune- Orangé
RHA	Rhamnose (Acidification)		
MDG	& Méthyle- D- Glucoside (Acidification)		
RIB	Ribose (Acidification)		
GIP	Glucose -1-Phosphate (Acidification)		

II-2. Analyse quantitative :

Méthode ISO 11290-2. Dénombrement de *Listeria monocytogenes* à partir des denrées alimentaires.

a. Objet et domaine d'application :

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

b. Dénombrement de Listeria monocytogenes :

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

c. Principe :

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

- Préparation de la suspension mère dans un diluant.
- Revivification pendant une heure à 20°C.
- Inoculation en surface du milieu sélectif solide coulé dans deux boîtes de Pétri, à raison de 0,1 ml par plaque.
- Incubation des boîtes à 35 ou 37°C et examen après 24 à 48 heures.
- Confirmation des colonies présumées de *Listeria monocytogenes*.
- Calculer le nombre de *Listeria monocytogenes* à partir du nombre de colonies confirmées par gramme ou par millilitre.

d. Mode opératoire :**1- Prise d'essai, suspension mère et dilutions :**

Pour préparer la suspension mère, utiliser comme diluant le milieu de base du bouillon Fraser au demi. Ce milieu peut être utilisé comme diluant pour le produit alimentaire si la méthode de recherche (ISO 11290-1) et la méthode de dénombrement sont effectuées sur le même échantillon pour essai.

Cette opération permet d'éviter la préparation de deux suspensions mères. Les agents sélectifs ne sont ajoutés à la suspension mère qu'après la prise d'essai pour dénombrement.

Et sont comme suit :

- L'acriflavine qui inhibe la croissance de la microflore secondaire Gram positif, y compris *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*.
- L'acide nalidixique qui bloque la réplication de l'ADN des microorganismes sensibles à cet antimicrobien (Gram négatifs surtout).
- Le citrate ammoniacal de fer qui permet de visualiser l'esculétine produite par *Listeria* à partir de l'esculine présente dans le milieu.

Ajouter 2,25ml de supplément Fraser à la suspension mère. Laisser reposer pendant 1 heure \pm 5 minutes à 20°C (T° ambiante) en utilisant si nécessaire une étuve afin de revivifier les microorganismes stressés.

Ensuite, préparer une gamme des dilutions décimales (10^{-2} , 10^{-3}) par l'ajout d'un aliquote de 1ml de suspension mère dans 9ml de bouillon Fraser additionnée du 0,1ml supplément. (Annexe...)

2. Ensemencement et incubation :

A l'aide d'une pipette stérile, transférer 0,1 ml de la suspension mère ou des ses dilutions à la surface d'une boîte, contenant de la gélose PALCAM (fondue, refroidie, additionnée d'agents sélectifs correspondants sont cités en annexe III, puis coulée en boîtes et séchée).

Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface de la gélose et incubé à l'étuve à 37°C.

II-3. Dénombrement des colonies caractéristiques :

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

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

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

II-3-1. Confirmation du Genre *Listeria spp* :

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

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

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

a. Réaction de la Catalase :

Mettre en suspension sur une lame une colonie isolée dans une goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène. La formation de bulles indique une réaction positive.

b. Observation microscopique :

Effectuer une coloration de Gram sur une colonie isolée. La présence de petits et minces bacilles à Gram positifs est en faveur du genre *Listeria*.

II-3-2. Confirmation de l'espèce *Listeria monocytogenes* :

a- Examen de la mobilité :

Prélever une colonie isolée et la mettre en suspension dans un tube contenant le bouillon TSYEB, à incuber à 25°C pendant 8 à 24 heures jusqu'à ce qu'un trouble apparaisse.

Observer au microscope optique au grossissement 40, une goutte de ce bouillon entre lame et lamelle.

* *Listeria monocytogenes* apparaît sous forme de bacilles minces et courts animés d'une mobilité en forme de pirouette.

* En alternative, on peutensemencer à l'aide d'un fil droit une gélose mobilité à partir d'une colonie sur gélose TSYEA, à incuber à 25°C pendant 24 à 48 heures

- *Listeria monocytogenes* donne une culture typique sous forme d'un parapluie immédiatement sous la surface de la gélose.

b- Recherche de l'hémolyse :

Prélever une colonie isolée à partir de la gélose TSYEA et l'isoler sur une plaque de gélose au sang à l'aide d'un fil droit.

Inoculer en parallèle, une culture témoin positive (*Listeria monocytogenes*) et négative (*Listeria innocua*).

.

II-3-3. Expression des résultats :

Selon la référence ISO 11290-2, pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de calculer la valeur de **a** pour chacune des boîtes retenues selon la formule suivante : en prenant en considération les boîtes contenant au minimum 15 colonies.

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

Où :

a : est le nombre de *Listeria* identifiées sur chaque boîte retenue.

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

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

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

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

$$N = \frac{\sum a}{V (n_{\text{1}} + 0,1 n_{\text{2}}) d}$$

Ou :

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

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

n_{1} : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution.

n_{2} : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution.

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

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

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

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

1. Résultats des prélèvements positifs pour la présence de *Listeria* :

Au cours de notre travail, nous avons traité **76** prélèvements issus des différentes étapes composantes de la chaîne de production du fromage analysé, à partir du lait de vache cru jusqu'au produit fini.

Comme on l'a déjà indiqué le matériel biologique est représenté par des échantillons prélevés aseptiquement sur les différentes étapes de **03 productions** du fromage étudié de type EDAM 1 kg, sur une période allant du **07 Avril 2014 jusqu'au 29 Juin 2014**

La répartition des prélèvements a été réalisée comme suit :

Tableau VI : Répartition des prélèvements sur les 3 productions

Production	Numéro de prélèvement
1^{ère} production	(01-25)
2^{ème} production	(26-50)
3^{ème} production	(51-76)

Sur les **76** prélèvements analysés, **12** soit **15,79 %** sont suspectés être positifs et indiquant la présence de *Listeria spp*

Les résultats de l'analyse de l'ensemble des prélèvements sont représentés dans le tableau VII

Tableau VII : Résultats de la suspicion de présence de *Listeria* dans l'ensemble des prélèvements analysés

	Nombre	Pourcentage
Prélèvements positifs	12	15,79 %
Prélèvement négatifs	64	84,21 %
Total	76	100 %

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

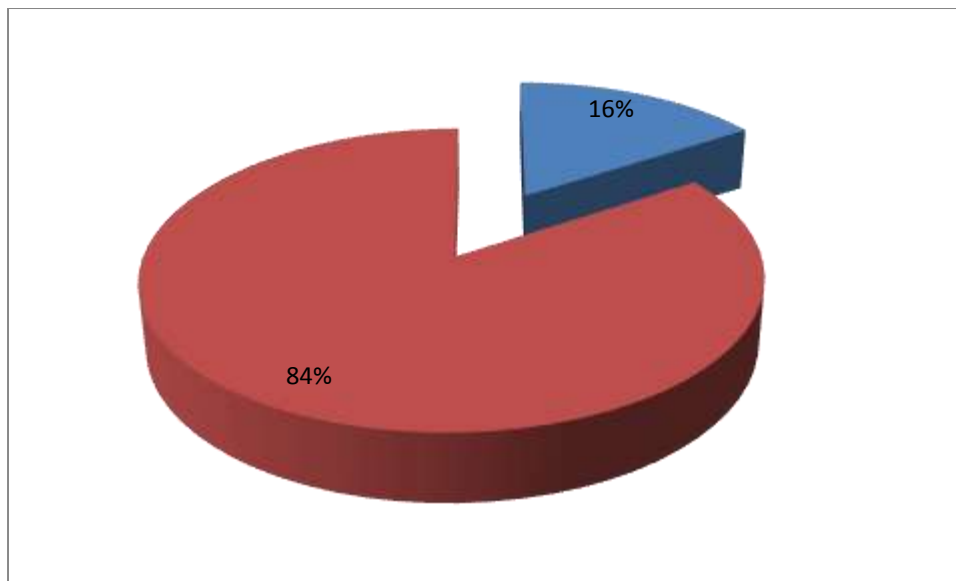
Prélèvements contaminés ■Prélèvements contaminés ■

Figure n° 5 : Résultats de la suspicion de présence de *Listeria spp* dans l'ensemble des prélèvements analysés

Les 12 prélèvements suspectés être positifs ont été prélevés à partir des étapes suivantes :

Tableau VIII : Répartition des prélèvements suspectés être positifs sur la chaîne de production

Etapes	Nombre de souches
Collecteurs de lait cru de vache	07
Avant pasteurisation	01
Après pasteurisation	01
Après maturation (lait caillé en cuve)	01
Après maturation (sortie cuve)	01
Après saumurage	01
	12

Alors on a :

- ✓ **07** prélèvements soit **58,33 %** : Collecteurs de lait de vache.
- ✓ **01** prélèvement soit **8,33 %** : Avant pasteurisation
- ✓ **01** prélèvement soit **8,33 %** : Après pasteurisation.

- ✓ 01 prélèvement soit 8,33 % : Après maturation (lait en cuve)
- ✓ 01 prélèvement soit 8,33 % : Après maturation (sortie cuve)
- ✓ 01 prélèvement soit 8,33 % : Après saumurage

La figure suivante montre le taux et la répartition des 12 prélèvements suspectés être positifs selon les étapes d'où ils ont été prélevés :

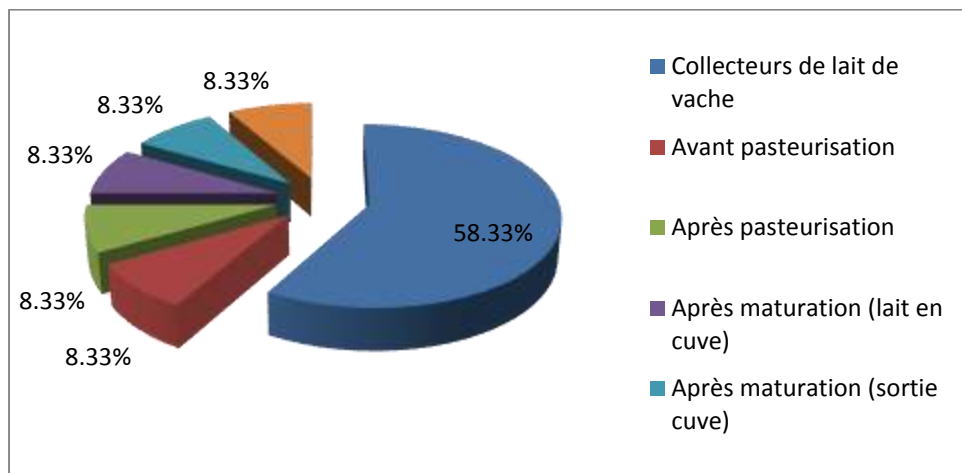


Figure n° 6 : Taux et répartition des 12 prélèvements suspectés être positifs selon les étapes d'où ils ont été prélevés

2. Résultats de l'identification biochimique des souches isolées :

L'identification des souches isolées est fondée sur les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques que nous avons obtenus.

2.1. Identification du genre :

- **Aspect morphologique :**



Figure n°7 : Aspect des colonies de Listeria sur gélose PALCAM après 24 heures d'incubation à 37°C (Personnelle)

- **Aspect au Gram :**

Toutes les souches suspectes isolées à partir des **12** échantillons sont des petits bacilles Gram positif, droits aux extrémités arrondies, isolés en paires, formants des angles « V ».

- **Test de la catalase :**

Ce test s'est révélé positif pour toutes les souches suspectes.



Figure n°8 : Aspect de la réaction catalase(Personnelle)

- **La mobilité :**

Les **12** souches isolées sont mobiles à 20°-25° C, le test révèle l'image d'un sapin renversé (parapluie) caractéristique, tel qu'on peut le remarquer sur la Figure n° 9.



Figure n°9 : Aspect de *Listeria* sur gélose Mannitol mobilité à 25°C(Personnelle)

2.2. Identification de l'espèce :

2.2.1. Par la galerie classique :

- **L'hémolyse :**

Seules les 3 espèces : *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* et *Listeria seeliger* sont β hémolytique, après 24 heures d'incubation à 37°C. L'observation des souches isolées sur

gélose au sang de mouton, révèle une zone étroite d'hémolyse de type β caractéristique de *Listeria monocytogenes* à l'inverse de *Listeria innocua* qui n'est pas hémolytique (Satura, 1998) (Figure n°10)

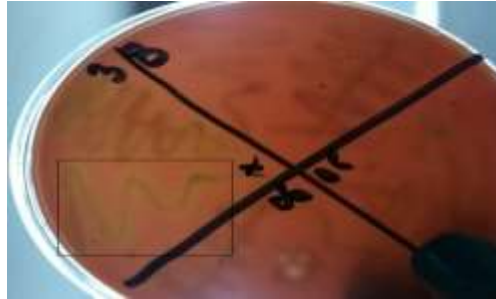


Figure n°10 : Aspect des colonies *Listeria* sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures(Personnelle) (1)

- **Test de l'Esculine :**

L'hydrolyse de l'Esculine conduit à la libération du glucose et de l'Esculine, qui donne une coloration noire en présence de sels de fer.

Dans la galerie biochimique classique on a recherché aussi les tests suivants :

- Voges Proskauer (VP) et Rouge de Méthyle (RM).
- Fermentation des sucres sur TSI.
- Urée-indole.
- Dégradation de Citrate de Simmons.
- Mobilité à 22°C.

Après la lecture de la galerie classique, on détermine les espèces en se référant au tableau des caractères biochimiques différentiels des espèces *Listeria* figurant en **Annexe I**

Remarque :

D'après la norme sur laquelle on s'est appuyé pour la réalisation de notre travail :

Toutes les colonies isolées des 12 échantillons déjà décrits auparavant présentant :

1- Une réaction catalase positif

2- Apparaissent sous forme de petits et mines bacilles Gram positif par examen microscopique.

3- Mobiles sur gélose mobilité à 20-25°C

 *Listeria spp*

Les résultats de l'identification biochimique et le test d'hémolyse sur gélose au sang de mouton des souches isolées sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau IX : Résultats de l'identification biochimique et de test d'hémolyse sur gélose au sang des souches isolées par la galerie classique

Paramètres N° des souches suspectes	Catal- ase	Gram	Oxyd ase	Mobilité	Esc	Glucose	Sac/Lac	Gaz	H ₂ S	Urée Indole	TDA	VP	RM	Hémo- lyse
Souche présumée 1	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Souche présumée 2	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Souche présumée 3	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Souche présumée 4	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Souche présumée 5	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Souche présumée 6	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Souche présumée 7	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Souche présumée 8	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+
Souche présumée 9	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Souche présumée 10	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-
Souche présumée 11	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Souche présumée 12	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+/-	-

Selon Larpent, 2004, le caractère biochimique RM du genre *Listeria* est positif, pour cela

07 souches présumées être positifs portant les numéros suivants : 02, 03, 05, 06, 10, 11, et 12 ont été éliminées.

* les 05 souches positifs on été isolées sur gélose au sang de mouton, 02 ne révèlent aucune zone claire, comme le montre la figure suivante :



Figure n°11 : Aspect des colonies *Listeria* sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures(Personnelle) (2)

* 03 souches, révèlent une zone large de β hémolyse, comme le montre la photo suivante :



Figure n°12 : Aspect des colonies *Listeria* sur gélose au sang de mouton après incubation à 37°C pendant 24 heures(Personnelle) (3)

D'après la norme :

- *L.monocytogenes* : montrent des zones étroites, claires et légères de β hémolyse.
- *L.innocua* : on n'observe aucune zone claire.
- *L.ivanovii* : forment habituellement de larges zones de β hémolyse nettement délimitées.

De ce fait :

- Les 02 souches ne révélant aucune zone claire sont des *L.innocua*.
- Les 03 souches formant une large zone de β hémolyse sont des *L.ivanovii*.

Parmi les 12 souches suspectés être de *Listeria spp* nous avons identifié :

- ✓ **2** souches de *L.ivanovii*
- ✓ **3** souches de *L.innocua*

2.2.2. Par la galerie API Listeria :

Après 24h d'incubation et l'adjonction du réactif ZYM.B, le profil de la galerie miniaturisée API Listeria des souches isolée n'ont montré aucun profil figurant sur la liste de la galerie **annexe IV**, cela est peut être due aux problèmes de contaminations de l'environnement.

3. Résultats du dénombrement :

Selon la norme ISO 11290-2. Le dénombrement se fait pour calculer le nombre de *Listeria monocytogenes* par millilitre ou par gramme, vu qu'on à pas trouvé de *Listeria monocytogenes*, on pas dénombré.

4. Discussion des résultats de l'identification des espèces de Listeria :

La présence de *Listeria spp* a été mise en évidence dans **5** prélèvements, issus de différentes étapes composantes de la chaîne de production du type de fromage analysé, fabriqué à base de lait de vache cru. A partir de **76** prélèvements, soit un taux de **6,57 %**, **01** prélèvement soit **20 %** avant la pasteurisation du lait (tank de mélange), le même nombre de prélèvement après maturation (lait caillé en cuve), **03** prélèvements soit **60 %** dans le lait de vache cru.

Sur les **76** prélèvements analysés, **5** espèces de *Listeria* ont été mise en évidence à savoir :
Listeria innocua : **03 souches soit 3,94 %**, espèce non pathogène la plus proche de *Listeria monocytogenes*

Listeria ivanovii : **02 souches soit 2,63 %** espèce pathogène des ruminants (**Larpen, 2004**)

Nous n'avons pas trouvé de *Listeria monocytogenes* au cours de notre expérimentation, cela peut s'expliquer par le fait que, Les bactéries lactiques produisent différents composés bactéricides. Parmi ceux-ci les bactériocines. Certaines d'entre elles inhibent la croissance de *Listeria monocytogenes*. **(Hechard Y et al. 1993)**

La caractérisation de *Listeria innocua*, parmi les colonies suspectes ne permet pas d'exclure la possibilité que *L.monocytogenes* soit présente dans l'échantillon car il est reconnu et établi que *Listeria innocua* présente un taux de croissance plus rapide que *Listeria monocytogenes*. **(Curiale et Lewis, 1994)**

L'absence des deux espèces trouvées dans le lait de collecte d'une des productions, après pasteurisation, témoigne le bon déroulement du traitement thermique. Tandis que la présence de *L.innocua* après maturation, dans une autre production dont l'origine de cette espèce est le lait de collecte signale une défaillance du système de pasteurisation.

Selon Baazize, 2006 la présence de *L.innocua* pourrait s'expliquer par la mauvaise qualité bactériologique du lait cru provenant de nos élevages.

Selon les résultats des analyses bactériologiques réalisés au niveau du laboratoire d'autocontrôle de l'unité de BOUDOUAOU, le lait est de classe « C », cela explique nos résultats.

La présence de *L.ivanovii* pourrait s'expliquer par :

L'insuffisance de la propreté des vaches, d'entretien de l'aire d'exercice, de surface de couchage par vache, l'hygiène de la traite l'insuffisance de l'éclairage du local de traite (si les trayons sont sales, on le voit mal), du nettoyage du parc d'attente, de la propreté du local de traite, c'est des facteurs de contamination par *Listeria*

Le lait cru peut être contaminé soit par un animal malade excréteur, soit au moment de la traite par contamination fécale ou contamination du lait par les aliments du bétail. **(Menard et al. 1994)**

Nombreux sont les paramètres qui conditionnent la multiplication des *Listeria* et seront donc à même d'être utilisés afin d'inhiber la croissance de cette bactérie à savoir : La température, le pH, les sels,... ect (**Nicklaus, 2001**).

Le traitement thermique est un point critique pour le contrôle des bactéries du genre *Listeria* dans de nombreuses entreprises de fabrication d'aliments.

Cet organisme semble être plus résistant à la chaleur que la plupart d'autres agents d'origine alimentaire non sporulés (**Mackey et al ;1989**).

La cuisson des aliments à une température interne de 70°C pendant 15 secondes est suffisante pour assurer la destruction de *Listeria* (**Mackey et al ; 1989**).

La présence de *Listeria* après la pasteurisation montre que cette dernière n'a pas été efficace



Conclusion

Conclusion

Les bactéries pathogènes ont toujours constitué un véritable danger pour la santé de l'homme.

Elles sont responsables de nombreuses infections et intoxications aux quelles nous sommes tous exposés. Il est donc impératif de maîtriser leur identification et leur dénombrement dans nos aliments.

La *Listeria monocytogenes* aussi bien pathogène pour l'homme que pour l'animal, doit être recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle car elle peut être à l'origine d'intoxications alimentaires graves.

Les produits transformés prêts à consommer parmi lesquels se retrouvent les fromages au lait cru sont particulièrement concernés.

Sur les **76** prélèvements effectués, nous avons isolés et identifié **05** souches de *Listeria* dont **03** *Listeria innocua*, soit un taux de **3,94%**, certes non pathogène pour l'homme, mais sa présence n'exclut pas celle de *Listeria monocytogenes*.

02 *Listeria ivanovii* soit un taux de **2,63 %** ont été isolé espèce pathogène des ruminants, sa présence est liée à l'insuffisance de la propreté des vaches, l'hygiène de la traite et de la propreté du local de traite.

Par ailleurs, l'ensemble des résultats obtenus sur les **76** échantillons analysés montre **le non-respect** à la réglementation imposées pour le lait cru et les fromages, la présence de *Listeria innocua* et *Listeria ivanovii* dans le fromage étudié fabriqué a base de lait de vache cru peut présenter un risque pour la santé du consommateur.

De ce fait des actions d'information, de formation et de sensibilisation doivent être programmées. Les consommateurs ne doivent pas être oubliés et particulièrement les consommateurs à risque comme la femme enceinte qui doit éviter de consommer ces catégories d'aliments.

En Algérie, l'absence totale de *Listeria* et particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans 25 grammes ou millilitres de toutes les denrées alimentaires semble illusoire et une réglementation aussi sévère n'est hélas pas respectée.

Pour les produits au lait cru, la prévention commence au niveau de l'élevage (qualité de l'ensilage) et de la production de lait (hygiène à la traite).

Au niveau de cette laiterie un système HACCP doit être mis en place pour la maîtrise du traitement thermique et le respect des règles élémentaires d'hygiène qui vont permettre de limiter le développement des *Listeria* éventuellement présentes.

Recommandations

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

❖ Au niveau des productions agricoles :

Dans les élevages (production de viande ou de lait) :

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

❖ Dans les industries de transformation :

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

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

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

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

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

❖ **Chez le consommateur :**

Pour toutes les personnes, il est recommandé :

- ✓ D'éviter la consommation de lait cru et de produits à base de lait cru ;
- ✓ De cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale ;
- ✓ de nettoyer fréquemment le réfrigérateur et le désinfecter ensuite avec de l'eau javellisée.

- ✓ De respecter les dates limites de consommation ;
- ✓ D'éviter les côûtes des fromages.
- ✓ De laver les mains, nettoyer les ustensiles de cuisine avec de l'eau de javellisée.

A decorative horizontal border with a scroll-like appearance, featuring rounded ends and a slight shadow effect.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1) **Amgar A. (1991)** : Compte-rendu de la conférence internationale *Listeria* et sécurité alimentaire .Ed.laval.ASEPT ; 220 P.
- 2) **Avril J. L. et Fauchère J.L. (2002)** : Bactériologie générale et médicale. Ed. Ellipse ; pp : 297-299.
- 3) **Bellouni R. (1990)** : *Listeria monocytogenes*, bactériologie et épidémiologie Thèse de Doctorat en médecine DESM, Inessem.Alger : 165p
- 4) **Bind J.L. (1990)** : Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en industrie agro-alimentaire. Recueil du Séminaire CPCIA.Paris : pp55-76 .
- 5) **Bind J.L, Avoyne (C), et Delaval (J). (1996)** : Analyse critique des méthodes d'isolement, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en agro-alimentaire. Pathologie Biologie. Vol 44, n°9, pp 757-768
- 6) **Bouayad L et Hamdi T.M (2012)** : Prévalence de *Listeria spp*, en aliments prêts à consommer (RTE) d'Alger (Algérie)
- 7) **Bourgeois C.M, Mescle J.F. et Zucca J. (1996)** : Microbiologie alimentaire, aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome ; pp : 90-102.
- 8) **Carles B, Jacquet C, Duthoit L, Facon J.L et Recourt J. (1998)** : Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la détection rapide de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires : Rapid'L.mono. Recueil SANOFI-Diagnostic-Pasteur, pp 1-22
- 9) **Delarras.C (2007)** : Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier ; pp : 297-313.
- 10) **Eck A, Gillis J.C. (1997)** : Le fromage de la science à l'assurance-qualité; 3^{ème} édition. Paris, Lavoisier : Technique et documents, 1997 : pp 7-8
- 11) **Euzéby J.P. (200)** : Dictionnaire de bactériologie Vétérinaire : Les *listeria*. pp 1-35
- 12) **Federighi.M(2005)** : Bacteriologie alimentaire ; compendium d'hygiène des aliments.2^{ème} Ed.Economica. pp : 97-125.
- 13) **Hamdi T.M., Naim M, Martin P, Jacquet C (2007)** : Identification et caractérisation moléculaire de *Listeria monocytogenes* isolées dans le lait cru dans la région d'Alger (Algérie).

- 14) **Hechard Y, Renault D, Cenatiemp Y, Letellier F, Maftah A, Jayat C, Bressolier P, Ratinaud M.H, R.Julien, Fleury Y, Delfour A. (1993)** : Influence de la flore d'affinage des fromages traditionnels sur la présence de *Listeria spp.*
- 15) **Jacquet C.H.(1995)** : Sécurité alimentaire du consommateur, *Listeria* et listériose humaine, pp : 22-38.
- 16) **Lahellec C. (2005)** : Risques et crises alimentaires. Ed. Lavoisier ; pp : 219-243.
- 17) **Larpent J.P. (2000)** : *Listeria*. 3^{ème} Ed. Lavoisier. Paris . 239p.
- 18) **Larpent J.P.(2004)** : *Listeria*.2^{ème} Ed. Lavoisier. Paris. 157p.
- 19) **Lebres EA. (2002)** : Listeriose bovine en Algérie, isolement et identification à partir du lait cru de vache.Thèse de magistère .Institut des sciences vétérinaires. Blida.105p.
- 20) **Lebres EA. (2006)** : Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans laits crus dans la région centre. Thèse doctorale. El-taref. 151p.
- 21) **Le Minor L. et Verron M. (1990)** : Bactériologie médicale. 2^{ème} Ed. Flammarion ; 781p.
- 22) **Mackey B.M, ET Bratchel, AFRC Institute of food Research, Bristol laboratory, longford, Bristol BS 18 7 D Y, U K. (1989)** : La résistance à la chaleur de la bacteria *Listeria Monocytogenes*.
- 23) **Menard J.L, Sanaa.M. (1994)** : Origines et prévention de la contamination de lait cru par *Listeria monocytogenes*.
- 24) **Moll M. et Moll N. (2002)** : sécurité alimentaire du consommateur. 1^{ème} Ed. Lavoisier. Paris ; pp : 36-51.
- 25) **Moll.M et Moll.N (2006)** : Sécurité alimentaire du consommateur. 2^{ème} Ed.Lavoisier. Paris ; pp : 26-45.
- 26) **Niclaus D. (2001)** : *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés. Etude bibliographique N°53. Ecole nationale vétérinaire. Lyon. P 148.
- 27) **Portalier D. (2002)** : *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Etude bibliographique N° 139. Ecole national vétérinaire. Lyon
- 28) **Recourt J., Bille J. et Swaminathan B. (1999)** : *Listeria*. 7^{ème} Ed ; pp : 346-356.
- 29) **Rocourt J. (1996)** : Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *Listeria monocytogenes* ; pp : 746-756.
- 30) **Recourt 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
- 31) **Singleton P. (2005)** : Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies.6^{ème} Ed.Dunod.526p.

32) Sutra L., Federighi M. et Jouve J. (1998) : Manuel de bactériologie alimentaire. Ed. Polytechnica , pp : 133-162.

Autres :

33) J.O.R.A.D.P., 1990 : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et populaire. N°05 (1990), Ministère du commerce.

34) J.O.R.A.D.P., 1998 : Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et populaire. N°35 (1998), Ministère du commerce.

35) Jornal Officiel de la République Française N°2006-8008 (2006) : Ministère de l'Agriculture et de la pêche.

36) FAO. (2004) : Evaluation des risques liés à *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer ; série évaluation des risques microbiologique



Annexes

Annexe I

Tableau X : Caractères biochimiques différentiels des espèces *Listeria* (Larpent, 2004)

Caractéristiques	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria murayi</i>	<i>Jonesia denitrificans</i>
Bâtonnets irréguliers	-	-	-	-	-	-	-	-
B-hémolyse	+	-	+	-	-	-	-	-
Camp-test Staphylococcus Rhodococcus	+	-	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	-	-	-
Production d'acide à partir :								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Listeria arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextrine	+/-	-	-	-	-	+	+	+
Galactose	+/-	-	-	-	+/-	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+	+	+
Lactose	+/-	-	-	-	+	+	+	+
D-lyxose	-	+	-	-	-	+	+	-
Mannitol	+/-	-	-	-	+/-	-	-	-
Mélézoïse	-	+/-	-	-	+/-	-	-	-
Mélibiose	+	-	-	+	+	+	+	-
& Méthyl-D-glucoside	+	+	-	+	-	-	+/-	-
& Méthyl-D-mannoside	+/-	+/-	-	+/-	-	-	-	-
Listeria-Rhamnose	-	-	-	-	+/-	+	+	-
Sorbitol	-	-	-	-	+	-	-	+
Amidon soluble	+	+/-	+	+	+	-	-	+
Saccharose	+/-	-	+	+	-	+	+	+
D-Xylose	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-
D-Tagatose	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	-
D-Turanose	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	-
Vogues-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyse de :								
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	+
Hippurate	+	+	+	+	+	-	-	-
Amidon	+/-	+/-	-	-	-	-	-	+
Esculine	+	+	-	-	+	+	+	+
Lécithinase	+/-	+/-	+	+	+	-	-	-
Phosphate acide (APIZym)	+	+	+	+	+	-	-	-
Phosphoamidase (APIZym)	+	+	+	+	+	-	-	-
Réduction de NO ₃ en NO ₂								
Pathogénécité pour la souris	+	-	-	-	+	-	-	+
G + C (% MOL)	37-39	36-38	36	36	37-38	41-42	41-42	56-58

Annexe II

Tableau XI : Les principaux épidémies de Listériose humaines d'origine alimentaire depuis 1980 et les épidémies française (**FEDERIGHI, 2005**)

Pays, régions ou villes	Nombre de cas	Nombre de cas mortels	Aliments incriminés
Boston (1979)	20	25	Céleri, tomate, salade(s)
Canada (1981)	41	41	Salade de chou cru
Massachusetts (1983)	49	29	Lait pasteurisé(s)
Californie (1985)	142	34	Fromage de type mexicain
Suisse (1983-1987)	122	27	Fromage (Vacherin)
USA (1986-1987)	36	44	?
Royaume Uni (1987-1989)	> 300		Pâté
USA (1989)	10	10	Crevettes
France (1992)	279	31	Langue de porc en gelée
France (1993)	39	32	Rillettes
Italie (1993)	18		Salade de riz
France (1995)	36		Lait chocolaté
France (1997)	14		Fromage à pâte molle
Italie (1997)	1566	21	Salade de maïs
USA (1998)	101	Au moins 10	Hot-dogs, plats cuisinés
Finlande (1999)	14	Au moins 2	?
France (1999)	3		Fromage type époisses
France (1999)	6		Rillettes
France (1999-2000)	32	31	Langue de porc en gelée

Annexe III

Matériel de travail

Equipement de laboratoire :

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

- Tubes à essai stériles.
- Flacons stériles.
- Pipettes pasteur.
- Pipettes graduées stériles de (1-2-5-10-20 ml)
- Boîtes de Pétri stériles.
- Étuve de 30 °C et 37°C.
- Stomacher.
- Microscope photonique.
- Bec Benzène.
- Balance.
- Glacière.
- Portoirs, pinces et des lames microscopiques.

Milieux de culture :

- Bouillon FRASER.
- Gélose PALCAME.
- Gélose OXFORD
- Gélose au sang.
- Milieu de CLARK et LUBS.
- Milieu Urée -Indole.
- Gélose Manitol-Mobilité.
- Galerie API.

Réactifs :

- Les suppléments et additifs pour les milieux : PALCAM et FRASER.
- Les réactifs : VPI, VPII , KOVACS et TDA.
- Les colorants (Violet de gentiane, Lugol, Fuchsine), Alcool.
- Eau oxygénée.
- Huile à immersion.

I. les milieux de culture hydratés et déshydratés :

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

1. Bouillon de fraser :

Milieu pour l'enrichissement sélectif pour *Listeria*

Composition du milieu :

➤ Protéose de peptone.....	5
➤ Peptone .de .caséine.....	5
➤ Extrait de levure.....	5
➤ Extrait de viande.....	5
➤ Chlorure de sodium.....	20
➤ Di-sodium hydrogéophosphate.....	12
➤ Potassium dihydrogénophosphate.....	1,35
➤ Esculine.....	1
➤ Chlorure de lithium.....	3

pH=7,4+ /-0 2.

2. Gélose PALCAM :

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

Composition :

➤ Peptone de viande	23
➤ Extrait de levure.....	3
➤ Glucose.....	0.5
➤ Amidon.....	1
➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Esculine.....	0.8
➤ Citrate ferrique ammoniacal.....	0.5
➤ Chlorure de lithium	15
➤ Mannitol.....	10
➤ Rouge de phénol.....	0.08

- Agar (Columbia)18
pH=7

3. Gélose OXFORD :

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

Composition :

- Polypeptone	20,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
- Amidon.....	1,0 g
- Chlorure de sodium.....	5,0 g
- Esculine	1,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal	0,5 g
- Chlorure de lithium.....	15,0 g
- Cycloheximide.....	400,0 mg
- Colistine (sulfate)	20,0 mg
- Céfotétan	2,0 mg
- Fosfomycine.....	10,0 mg
- Acriflavine	5,0 mg
- Agar agar bactériologique.....	13,0 g

4. Gélose au sang :

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

Composition :

➤ Peptone de viande.....	10
➤ Peptone de caséine.....	5
➤ Extrait de levure.....	3
➤ Chlorure de sodium.....	5
➤ Agar.....	18

pH=6,9+/-0,1.

5. Mannitol mobilité :

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

Composition :

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

pH=8,1.

6. Milieu de Clarck et Lubs :

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

Composition :

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

pH=7.

7. Gélose TSI (Triple Sugar Iron) :

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

Composition :

- Peptone de viande.....	15
- Proteose peptone.....	5
- Extrait de viande.....	3
- Extrait de lavure.....	3
- Glucose.....	1
- Saccharose.....	10
- Lactose.....	10
- Citrate de fer ammoniacal.....	0.3
- Chlorure de sodium.....	5

- Sodium thiosulfate.....	0.3
- Rouge de phénol.....	0.5
- Agar.....	18

pH=7,4.

8. Urée indole :

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

Composition :

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

pH=8,1.

9. Agar à l'esculine :

Composition

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

II. les suppléments :

1. Supplément pour bouillon FRASER :

Composition :

- Acriflavine.....28,1mg.
- Acide nalidixique.....22,5mg.
- Citrate de fer III ammoniacal..... 1125mg.

Préparation :

Ajouter stérilement :

- 2,25ml du flacon à 225ml de bouillon FRASER.
- 0,1ml du flacon à 10ml de bouillon FRASER.

2. Supplément pour gélose PALCAM :

Composition :

- Sulfate de polymyxine B.....5000 UI.
- Ceftazidine.....10 mg.
- Acriflavine.....2,5 mg.

Préparation :

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

NB : il est indispensable d'éviter toute super exposition du supplément à la lumière.
L'Acriflavine peut être photo active et acquérir alors des propriétés inhibitrices vis-à-vis des *Listeria*

3. Supplément pour gélose OXFORD :

Composition :

- Cycloheximide200,0 mg
- Colistine (sulfate)10,0 mg
- Céftotétan1,0 mg
- Fosfomycine5,0 mg
- Acriflavine2,5 mg

III. Galerie API :

Composition :

La composition de la galerie est la suivant :

Milieu : API suspension medium

- eau

déminéralisée.....2ml.

Réactif : ZYM B (8ml)

2150 *Listeria ivanovii*

3750 *Listeria ivanovii*

- 2-Méthyléthanol.....100ml.

- Fast Blue BB (matière active).....0,12g.

Conditions de stockage :

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

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

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

NB : cette galerie est commercialisée, sous forme de réactifs déshydratés.

Dans le coffret, en y trouve :

- 10 galeries API *Listeria*.
- 10 ampoules de suspension Medium, 2 ml.
- 1 ampoule de réactif ZYM B.
- 10 boîtes d'incubation.
- 10 fiches de résultats.

Annexe IV

Liste des profils numériques

Annexe V

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

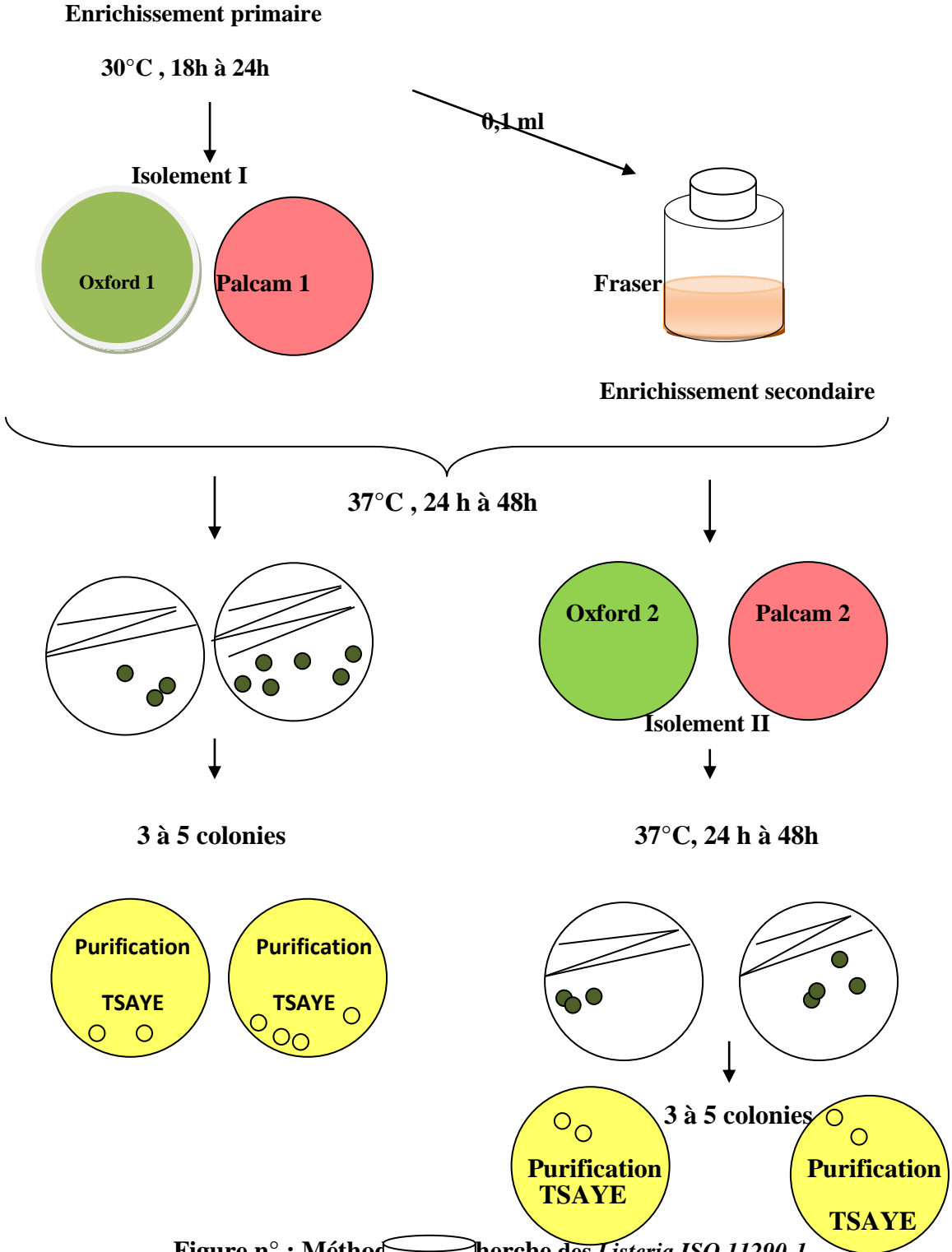
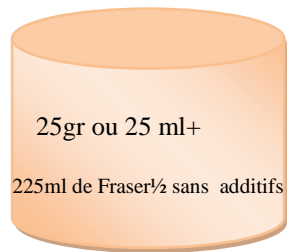
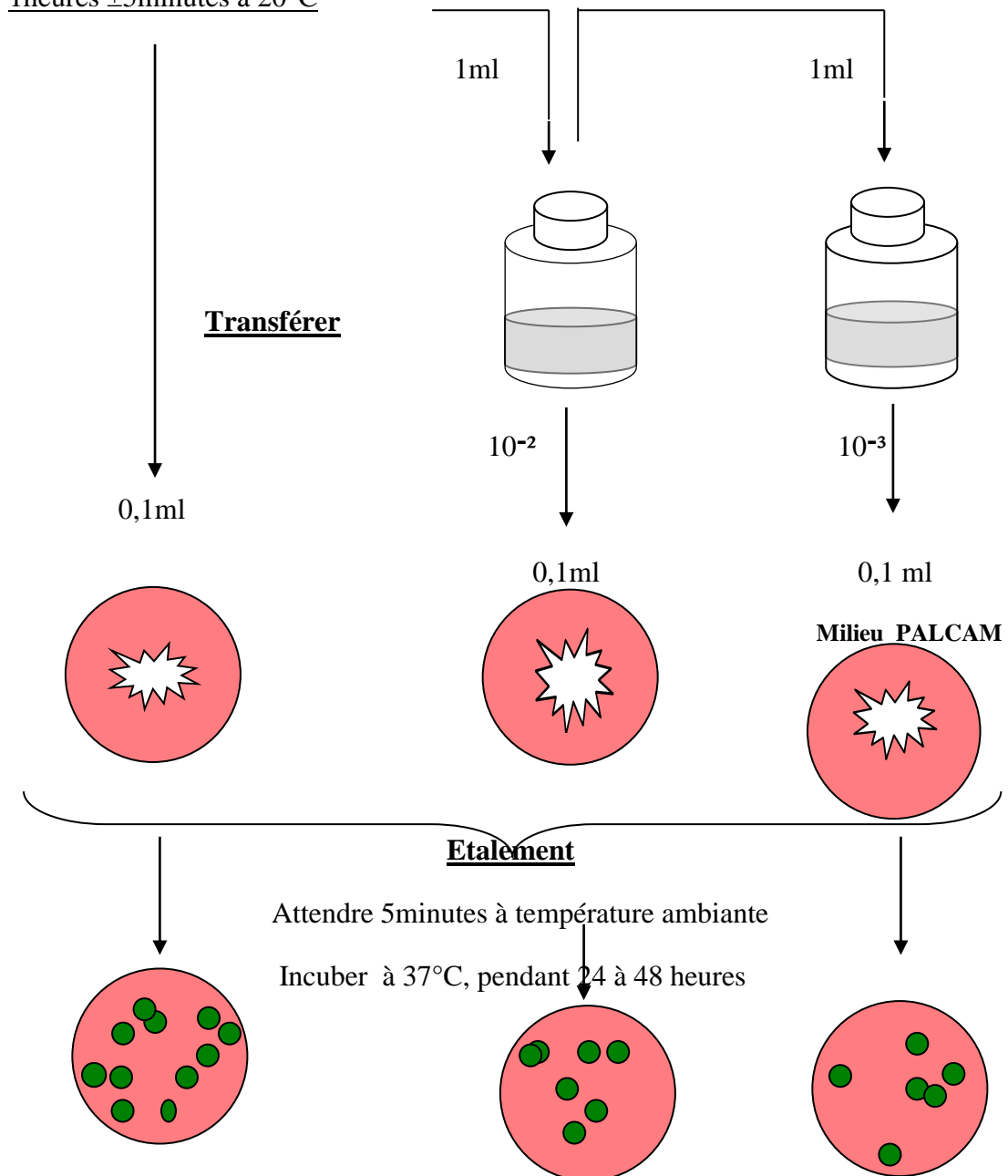


Figure n° : Méthode de recherche des *Listeria* ISO 11290-1



La dilution 10^{-1}

1 heures \pm 5 minutes à 20°C



Dénombrer les colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives

Identifier puis calculer la valeur de a puis de N après confirmation par API ou galerie classique.

Figure n° : Méthode du dénombrement des *Listeria* ISO 11290-2