



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

Université Saad DAHLAB, Blida  
Institut des Sciences Vétérinaires

**THEME**

"LISTERIOSE BOVINE EN ALGERIE :  
ISOLEMENT ET IDENTIFICATION A  
PARTIR DU LAIT CRU DE VACHE"

Présentée par :  
**El-Hadj-Ahmed LEBRES**

**Mémoire**  
Pour l'obtention du Diplôme de Magister  
en Sciences Vétérinaires  
**Option : REPRODUCTION**

**Le 12 Juin 2002**

## TABLE DES MATIERES

**RESUME**

**PROBLEMATIQUE**

### **PARTIE I : GENERALITES.**

**Pages**

**Chapitre I : Introduction.**

1

**Chapitre II : Historique.**

2

**Chapitre III : Taxonomie**

4

**Chapitre IV : Clinique de la listériose.**

5

IV.1.En médecine vétérinaire :

IV.1.1.L'avortement,

6

IV.1.2.L'encéphalite à Listeria.

7

IV.2.En médecine humaine :

10

IV.2.1.Formes foeto-maternelles et du nouveau-né,

IV.2.2.Formes de l'adulte.

11

IV.3.Immunité.

12

IV.4.Portage.

IV.5.Durée d'incubation.

**Chapitre V : Epidémiologie de la listériose.**

13

V.1.En médecine vétérinaire,

V.2.En médecine humaine.

**Chapitre VI : Mode de transmission.**

15

V.1.En médecine vétérinaire,

V.2.En médecine humaine.

16

**Chapitre VII : Dose infectante.**

17

**Chapitre VIII : Ecologie des Listeria.**

19

VIII.1.Le lait cru,

21

VIII.2.Le troupeau laitier,

VIII.3.L'ensilage,

22

VIII.4.La terre et le sol,

25

VIII.5.les autres alimentations animales.

**Chapitre IX : Bactériologie.**

26

IX.1.Structure et morphologie,

IX.2.Culture et croissance,

27

IX.3. Caractères biochimiques,	29
IX.4. Evolution des techniques de recherche des <i>Listeria</i> :	32
IX.4.1. Méthodes bactériologiques,	
IX.4.2. Méthodes immunochimiques,	36
IX.4.3. Méthodes immunophysiques,	37
IX.4.4. Méthodes physiques,	38
IX.4.5. Méthodes de biologie moléculaire.	39
IX.5. Lysotypie.	41
<b>Chapitre X : Pouvoir pathogène des <i>Listeria</i>.</b>	43
X.1. L'infection par <i>Listeria monocytogenes</i> :	
X.1.1. pouvoir pathogène expérimental : in vivo,	
X.1.2. Physiopathologie de la listériose,	
X.1.3. Description du cycle infectieux au niveau cellulaire : in vitro,	46
X.2. Les déterminants génétiques et moléculaires du pouvoir pathogène de <i>Listeria monocytogenes</i> :	48
X.2.1. entrée dans les cellules,	
X.2.2. Le mouvement intracellulaire de <i>Listeria monocytogenes</i> et le passage de cellule à cellule.	50
<b>Chapitre XI : Traitement de la listériose.</b>	51
XI.1. En médecine vétérinaire,	
XI.2. En médecine humaine.	
<b>Chapitre XII : Sensibilité des <i>Listeria</i> aux antibiotiques.</b>	53
<b>Chapitre XIII : Prophylaxie et recommandations.</b>	55
XIII.1. Prophylaxie dans les élevages,	
XIII.2. Prophylaxie dans les industries,	56
XIII.4. Prophylaxie chez l'homme.	57
<b><u>PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.</u></b>	
<b>Chapitre I : Objectifs.</b>	58
<b>Chapitre II : Prélèvements.</b>	59
<b>Chapitre III : Choix et intérêt de la méthode retenue.</b>	61
<b>Chapitre IV : Méthode AFNOR.</b>	62
IV.1. Enrichissement primaire,	
IV.2. Enrichissement secondaire et isolement,	
IV.3. Isolement, identification et purification,	
IV.4. Confirmation biochimique :	63
IV.4.1. Camp-test,	65
IV.4.2. Galerie biochimique : API – <i>Listeria</i> .	67

## **PARTIE III : RESULTATS.**

<b>Chapitre I : Analyse bactériologique.</b>	74
I.1.Premier lot	
I.2.Deuxième lot	
I.3.Troisième	75
I.4.Résultats globaux	
<b>Chapitre II : Répartition géographique des souches isolées</b>	76
<b>Chapitre III : Caractérisation biochimique</b>	77
<b>Chapitre IV : Ordre chronologique des souches isolées</b>	78
<b>Chapitre V : Lysotypie</b>	79

## **PARTIE IV : DISCUSSION**

<b>Chapitre I : Méthode d'analyse</b>	81
<b>Chapitre II : Analyse bactériologique</b>	83
II.1.Premier lot	
II.2.Deuxième lot	84
II.3.Troisième lot	
II.4.Résultat global	
<b>Chapitre III : Lysotypie</b>	86

## **PARTIE V : CONCLUSION**

## **PARTIE VI : RECOMMANDATIONS.**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

89-97

## **ANNEXES**

98-105

## Liste des Abréviations

ADN	:	Acide Désoxyribo Nucleïque
AFNOR	:	Association Française de Normalisation
AFSSA	:	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
API	:	Analytic Prophylactic Index
ARN	:	Acide Ribo Nucleïque
CAMP	:	Christie , Atkins , Munch , Petersen
FAD	:	Food and Drugs Administration
FIL	:	Fédération Internationale de Laiterie
GC	:	Guanine Cytosine
HACCP	:	Hasard Analysis Critical Control Point
ISO	:	International for Standardisation Organisation
PNDA	:	Programme National de Développement Agricole
OMS	:	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
RM	:	Rouge de Méthyl
TSEYA	:	Tryptone Soja Yeast Extract Agar
VP	:	Voges Proskauer
WHO	:	World Health Organisation

Mots clés : Lait, Listeria, Listériose, Transmission, Epidémie, Prophylaxie.

## RESUME

Depuis une quinzaine d'années, les *Listeria* font beaucoup parler d'elles. Elles ont été à l'origine de plusieurs épidémies qui ont touché les Etats Unis, le Canada, l'Angleterre, la Suisse et la France.

Chez l'homme, les accidents épidémiques dus à *Listeria monocytogenes* sont parfois graves, souvent spectaculaires, concernent des catégories bien précises de la population à savoir : personnes âgées, enfants, femmes enceintes, sujets immunodéprimés et se soldent généralement par un taux de mortalité de l'ordre de 25 à 30%.

Chez l'animal, les accidents épidémiques dus le plus souvent à *Listeria monocytogenes*, mais aussi à *Listeria ivanovii* (ovins et caprins), sont également graves et se soldent eux aussi par des taux de mortalité atteignant les 100% si un traitement précoce n'est pas mis en place.

Le mode de transmission de la listériose humaine et animale n'est plus à discuter, aujourd'hui ; il s'agit, rappelons le, du lait cru en ce qui concerne l'homme et l'ensilage en ce qui concerne l'animal.

Par ailleurs, et compte tenu :

- d'une part, des caractéristiques générales des *Listeria*, et particulièrement de *Listeria monocytogenes*, qui sont des bactéries extrêmement résistantes aux conditions du milieu extérieur,
  - d'autre part, de la grande variété de denrées alimentaires mises sur le marché national,
  - et d'autre part, encore vu les séquelles que peut engendrer une telle zoonose,
- il est urgent de mettre en place un réseau de surveillance épidémiologique à l'instar des pays occidentaux, dans le but de prendre les mesures préventives qui s'imposent afin d'arrêter à temps une éventuelle épidémie.

Au cours de notre travail, nous avons quand même, isolé 28 souches de *Listeria* dont 10 *monocytogenes*, 17 *innocua* et 1 *ivanovii* sur 1432 prélèvements de laits crus analysés, soit 1,96 %. Ce taux, loin d'être négligeable et similaire à ceux rapportés par la littérature, prouve qu'on n'est pas à l'abri d'une éventuelle épidémie.

## Problématique

Les médias nationaux et internationaux ont fait récemment état de l'apparition et de la gravité de différentes épidémies de listériose humaine survenues à travers le monde et notamment en France pour les deux dernières années, à la suite de l'ingestion d'aliments d'origine animale contaminés.

En Algérie, et face à l'augmentation du flux d'importations de denrées alimentaires ( laits et produits laitiers ) d'une part, et devant l'évolution de la consommation de ces mêmes produits, qui est passée de 80 litres par habitant et par an en 1980 à 119 litres par habitant et par an en 2000 d'autre part, notre curiosité scientifique a éveillé en nous, des suspicions, et nous nous sommes tout de suite senti menacés par cette bactérie étant donné la situation géographique.

A cela s'ajoute, l'instauration du PNDA qui encourage les éleveurs à l'importation et au développement de l'effectif du cheptel bovin laitier moderne, à partir de pays endémiques malheureusement.

Le dépistage précoce de cette maladie s'impose alors de lui-même.

De plus, et compte tenu du fait, qu'actuellement l'état encourage vivement les industriels agro-alimentaires à aller vers l'accréditation ISO 9000 et conscient que cette dernière inclut dans sa démarche, la mise en place de systèmes HACCP qui eux, visent, la maîtrise des points critiques, allant de la fourche à la fourchette, il est de plus en plus urgent pour nous, de s'intéresser aux questions relatives à l'hygiène environnementale immédiate des animaux de rente et aux éventuels accidents qui peuvent être engendrés.

En outre, les normes internationales exigent de nos jours, la recherche de *Listeria monocytogenes* systématiquement dans les denrées alimentaires, notamment dans les laits et dérivés.

Par ailleurs, sachant que cette bactérie est un germe ubiquiste, qu'elle est principalement véhiculée par le lait cru de vache, et qu'elle pose des problèmes tant sur le plan de la santé publique que sur celui de la santé animale que sur l'industrie alimentaire, nous avons donc décidé d'entamer des investigations dans ce sens. Ces dernières se sont avérées de plus en plus justifiées par le fait que la situation demeure à nos jours, inconnue en Algérie.

C'est pourquoi, la mise en place des techniques de recherche et d'identification biochimique de cette bactérie à partir du lait cru de vache s'impose d'elle-même et devient alors incontournable.

L'intérêt de cette étude est avant tout, d'ordre préventif, elle n'a pas la prétention de régler tous les problèmes liés à la prophylaxie de la listériose, elle pourra au moins donner une idée sur la situation épidémiologique en Algérie.

**PARTIE I**

**GENERALITES**



## Chapitre I : Introduction.

La listériose est une maladie quasiment inconnue des médecins, des vétérinaires et des microbiologistes jusqu'en 1960. Aujourd'hui elle intéresse désormais à la fois les cliniciens (médecins et vétérinaires), les épidémiologistes et les microbiologistes (médicaux et alimentaires), les généticiens ainsi que les autorités administratives. A cela s'ajoutent périodiquement les médias, notamment lors des épidémies qui jalonnent l'histoire de cette infection depuis plus d'une dizaine d'années.

C'est une zoonose essentiellement animale, accidentellement humaine.

Elle a fait l'objet d'études et d'observations particulières dès 1929 aussi bien chez l'homme que chez les animaux de rente. Les premières descriptions chez les animaux d'élevage sont faites en Nouvelle Zélande et aux Etats Unis en 1931 (82) et en 1940 en France (61, 102 ).

Cette maladie, a été découverte de plus en plus fréquemment chez les animaux de rente, mais aussi chez diverses espèces d'animaux sauvages (cf. tableau I).

*En médecine vétérinaire*, de nombreuses observations ont été faites et font état de cas isolés, de foyers importants sporadiques ou endémiques, de portages asymptomatiques observés sur diverses espèces animales (102).

*En médecine humaine*, la listériose est une maladie qui atteint préférentiellement la femme enceinte et l'enfant qu'elle porte, les immunodéprimés et les personnes âgées. Elle se manifeste principalement sous formes de méningites, de méningo-encéphalites, de septicémies et d'avortements prématurés (82,83,84).

Mais pour peu, qu'un de ces sujets soit en contact direct avec les animaux d'élevage, on n'est plus à l'abri d'une transmission directe ou indirecte.

*En industrie laitière*, les *Listeria* peuvent contaminer directement les produits et l'environnement par le biais des laits crus contaminés, entraînant ainsi d'énormes pertes aussi bien sur le plan de la santé publique (humaine) que sur le plan économique.

## Chapitre II : Historique.

La listériose est due à *Listeria monocytogenes*, espèce type du genre, qui est une bactérie à Gram positif, ubiquiste contaminant le sol, les végétaux, les ensilages, les murs des étables et par conséquent l'homme.

*Listeria monocytogenes*, doit son nom en grande partie à la mémoire du docteur John Lister. Elle est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes d'où son nom de monocytogenes.

Décrite pour la première fois en 1926 par Murray —Webb et Swann , lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes qui présentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie . Ils lui donnèrent alors le nom de *Bactérium monocytogenes*. Mais en réalité, l'histoire de *Listeria monocytogenes* commença bien avant (5, 26 ).

Hulphers , vétérinaire Suédois, fut le premier auteur à avoir décrit cette infection chez un lapin atteint de méningite en 1911.

Dumon et Cotoni, isolèrent la même souche à partir d'un liquide céphalorachidien (LCR) chez homme et cette souche demeure toujours conservée au niveau de l'Institut Pasteur de Paris depuis 1921 (23, 26 ).

D'autres chercheurs isolèrent la même bactérie dans des circonstances différentes à partir de 1926, parmi lesquels :

- Pirie, chez la gerbille en Afrique, décrite sous le nom de *Listerella hepatolytica* en 1927.
- Nyfeld , chez l'homme lors d'un syndrome mononucléosique , décrite sous le nom de *Bacterium monocytogenes hominis* en 1929.
- Burn , démontre le rôle de la bactérie dans l'infection périnatale en 1933.
- Sohier et coll , ont mis en évidence, à partir d'un sang de bœuf cuit, une seule souche de *Listeria* qui se différencie de *Listeria monocytogenes* par la réduction des nitrates et l'ont décritent sous le nom de *Listeria denitrificans* en 1948. Toutefois, cette dernière a été définitivement exclue du genre *Listeria* lors de la récente révision de la taxonomie. Cette bactérie corynéforme a été transférée dans le nouveau genre *Jonesia* dont elle constitue l'unique espèce.

- Reiss , Potel et Krebs (Allemands) décrivent la forme septicémique du nouveau - né , et les travaux de Seeliger ont montré que *Listeria monocytogenes* joue un rôle assez important aussi bien en pathologie humaine qu'en pathologie animale à partir de 1951.

**En Algérie, ont été décrit :**

- Le premier cas clinique de listériose humaine par Benallègue et coll en 1967.
- Bellouni R (1989) :
  - 11 souches de *Listeria*, réparties comme suit : 2 *Listeria monocytogenes* , 1 *Listeria welshimeri* , 2 *Listeria seeligeri* et 6 *Listeria innocua*,. à partir de 87 placentas de bovins.
  - 1 souche de *Listeria innocua* à partir de 16 fromages analysés (23).
- Ramdani N (1999), 5 cas humains (80).
- Lebres E (2000) :  
10 souches de *Listeria* dont 7 *Listeria monocytogenes* et 3 *Listeria innocua* à partir de 419 échantillons de denrées alimentaires autres que le lait (63).

### Chapitre III : Taxonomie.

En raison de sa morphologie à la coloration de Gram, petit bacille à Gram positif, *Listeria* a longtemps été considérée comme une bactérie corynéforme; il est actuellement admis que les bactéries de ce genre appartiennent à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Bacillus* (18, 89).

Dés 1966, la recherche de plus en plus fréquente de *Listeria* dans des niches écologiques variées a conduit à l'isolement de souches atypiques dont l'étude taxonomique a montré qu'il s'agit bien de nouvelles espèces.

En 1988, et compte tenu des travaux de J. Rocourt (89), dans le but de réviser la nomenclature des *Listeria*, on admet aujourd'hui, que le genre *Listeria* se définit sur le plan de la taxonomie par :

- un G + C % DNA compris entre 36 et 46 %,
  - un peptidoglycane branché en variation A1 Gamma associé à un type d'acide teichoïque ( polyribitol – phosphate ),
  - la présence d'acides lipoteichoïques,
  - l'absence d'acide mycolique et MK7, comme principal isoprenoid quinone.
- (18, 36).

Actuellement 6 espèces sont donc reconnues dans ce genre , en plus de *Listeria monocytogenes* , il s'agit de :

- *Listeria grayi* qui a été découverte en 1966 par Larsen et Seeliger à partir d'une coproculture chez un chinchilla ; cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol (26, 88, 89 ).
- *Listeria murrayi* qui a été découverte en 1971 par Welshimer et Meredith à partir d'une végétation ; une fois encore cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol et la réduction des nitrates (88, 89 ).
- *Listeria ivanovii* qui a été découverte en 1984 par le microbiologiste bulgare Ivanov lors d'avortements chez des brebis dans une ferme ; cette souche s'est caractérisée par une forte hémolyse, donc pathogène (26).
- *Listeria innocua* qui a été découverte en 1981 par Seeliger à partir de l'environnement et de l'intestin de l'homme et des animaux ; cette souche est par contre non hémolytique donc non pathogène (89).
- *Listeria seeligeri* et *Listeria welshimeri* qui ont été mises en évidence en 1982, lors des hybridations ADN / ADN (89).

## Chapitre IV : Clinique de la listériose.

### IV.1. En médecine vétérinaire.

En médecine vétérinaire, la listériose est une des affections qui s'estompe progressivement dans l'esprit du clinicien parce qu'elle n'est que rarement diagnostiquée.

Bien qu'elle affecte différentes espèces animales (cf. tableau I), elle peut évoluer sous des formes cliniques de façon sporadique ou endémique. Elle peut être également retrouvée en portage asymptomatique.

Tableau I : Espèces animales affectées par la listériose (102).

<b>Espèces</b>	<b>Expression maladies</b>	<b>Fréquence / Apparition</b>
<b>Bovins</b> <b>Ovins</b> <b>Caprins</b> <b>Ruminants sauvages</b> : Chevreuils <b>Lamas , Buffles</b>	Formes cliniques Formes cliniques Formes cliniques plus rares	Maladie sporadique ou endémique possible , rares enzooties dans les troupeaux
<b>Equins</b> <b>Baudet</b>	Formes cliniques plus rares	Rares cas dans les élevages
<b>Porcins</b>	Formes cliniques plus rares , Porteurs sains surtout	Rares cas dans les élevages
<b>Carnivores</b> : Chiens , Chats <b>Carnivores sauvages</b> : Renard , Raton laveur , Furet , Vison , Martre , Léopard , Coyotte	Formes cliniques très rares , Porteurs sains	
<b>Lagomorphes</b> : Lièvres , Lapins  Rongeurs : Rat , Souris , Cobaye , Chinchilla , Gerbille , Lemming , Ecureuil , Campagnol , Gabiai	Formes cliniques  Formes cliniques et Porteurs sains	Cas sporadiques dans les élevages . Formes endémiques ou enzootiques
<b>Oiseaux</b>	Formes cliniques	Cas sporadiques dans les élevages .
<b>Volailles</b> : Poule , Dindon , Pintade , Canard , Oie . <b>Pigeon</b> , Merle , Moineau , Mouette , Freux , Corbeau . <b>Gibier à plumes</b> : Faisan , Perdrix. <b>Perroquet</b> , Canari , Hibou des neiges , Grue .	Formes cliniques très rares , Porteurs sains	Cas individuels
<b>Poissons</b> : Carpe , Tanche , Truite , Silure	Formes cliniques	Cas sporadiques dans les étangs .
<b>Batraciens</b> : Grenouille , Crapaud , Salamandre	/	Porteurs sains
<b>Reptiles ophidiens</b> : Serpents	/	Porteurs sains
<b>Reptiles chéloniens</b> : Tortues	/	Porteurs sains

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

- l'avortement,
- l'encéphalite ou méningo-encéphalite.

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

#### IV.1.1.L'avortement.

L'utérus paraît être l'organe de loin le plus sensible au point que c'est cette localisation qu'on trouve chaque fois que l'infection s'installe chez un animal gravide. La listériose affecte en premier lieu les enveloppes fœtales et se transmet au veau par voie sanguine, secondairement les liquides amniotiques suite à une élimination bacillaire par voie urinaire (32, 51 ).

La source habituelle d'infection est l'ensilage et l'avortement se situe le plus souvent entre le quatrième et le septième mois et quelque fois entre le sixième et le huitième mois. La mort du fœtus est de règle ; il peut être emphysémateux ou momifié.

Si le veau reste encore vivant au moment de l'avortement, il meurt rapidement. On peut observer un écoulement vaginal purulent chez la mère avant l'expulsion du fœtus. Il y a rétention des enveloppes dans les deux tiers des cas.

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

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

L'affection apparaît surtout en hiver avec un maximum en janvier et février. Occasionnellement de décembre à avril (65, 96, 99 ).

Dans 80 % des cas étudiés par Dijkstra, les animaux étaient nourris aux ensilages et l'avortement a lieu le plus souvent quatre semaines après l'ouverture du silo, ce qui tend à faire croire que c'est là, la durée de l'incubation de l'infection (27).

#### IV.1.2.L'encéphalite à Listeria.

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

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

Du point de vue symptomatologie, il existe une entité clinique caractéristique qui, à elle seule, tient lieu de diagnostic. Il s'agit de l'encéphalite qui s'accompagne d'une atteinte du nerf facial trijumeau (27).

L'animal, présente simultanément :

- des troubles nerveux centraux des plus divers : ataxie, mouvements impulsifs, tremblements locaux ou généralisés.
- de la paralysie unilatérale de l'oreille, de la paupière, de la lèvre ou celle de la mâchoire inférieure,
- souvent aussi, une conjonctivite du côté de la paralysie et une panophtalmie. Cette paralysie, surajoutée, intéresse parfois la langue et le larynx rendant la déglutination impossible. Ce syndrome est également suspect mais il est moins pathognomonique. En l'absence de ces paralysies, spécialement celle unilatérale du facial ou celle du trijumeau, le diagnostic devient plus difficile.

Deux caractères particuliers sont néanmoins suffisamment caractéristiques et constants pour être des éléments de présomption (98, 103) :

- le premier caractère est le signe d'une atteinte cérébrale assez localisée. Il y a régulièrement **dominance des symptômes d'un seul côté** : anomalie du port de la tête, symptôme assez particulier, en ce sens qu'il s'agit d'une déviation latérale du cou ou ataxie d'un seul bipède latéral, mouvement impulsif latéral (tournevis).
- le second caractère est l'intensité de l'atteinte psychique et **la tendance précoce à une sorte de somnolence**.

Même si le vétérinaire intervient tardivement, le caractère unilatéral et cette somnolence restent des éléments qui ont frappé le propriétaire et qu'on peut ainsi retrouver après une bonne anamnèse.

Chez les bovins, l'évolution de l'affection est généralement assez longue, contrairement à ce qui se passe chez le mouton où la mort intervient en 3 à 4 jours. Les bovins eux, survivent pendant 8 à 15 jours et on voit cette somnolence se muer progressivement en un véritable coma qui conduit l'animal au décubitus, reproduisant à ce moment, un tableau très comparable à celui d'une fièvre de lait du type comateux.

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

Les principaux symptômes et la fréquence de l'encéphalite bovine à *Listéria* ont été rapporté par Dijkstra (27) :

- Tremblements musculaires .....	21
- Tournis à gauche .....	23
- Tournis à droite .....	22
- Ataxie .....	20
- Mouvements impulsifs .....	21
- Impossibilité de déglutition .....	23
- Salivation .....	20
- Paralysie de la langue .....	14
- Paralysie faciale unilatérale .....	8
- Paralysie faciale bilatérale .....	6
- Larmolements .....	13
- Phénomènes d'excitation .....	10
- Cécité .....	29
- Somnolence .....	10
- Paralysie des membres .....	18

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



**Tableau II : Manifestations cliniques de la listériose animale (102).**

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

On remarque qu'il y a prédominance des formes nerveuses et abortives par rapport aux formes septicémiques et encore plus aux formes localisées (conjonctivales, oculaires, pulmonaires, digestives et cutanées).

#### IV.2. En médecine humaine.

En médecine humaine, la listériose peut être schématiquement divisée en deux grands groupes d'infection, celles du nouveau-né et de la femme enceinte par opposition à celles de l'adulte.

L'atteinte du système nerveux central et la septicémie représentent, dans les deux cas, les principales formes cliniques (25, 61, 82).

##### IV.2.1. Formes foeto-maternelles et du nouveau-né.

Le premier cas de **listériose foeto-maternelle humaine** est apparu en 1935 et ce n'est qu'en 1955 que la relation entre la listériose de la mère et celle de l'enfant est mise en évidence et comprise du point de vue transmission hématogène transplacentaire. L'analyse anatomo-pathologique a permis de décrire les quatre voies de contamination suivantes (82) :

###### *- La voie hématogène transplacentaire :*

Suite à une infection, voire à une septicémie dans le mois qui précède l'accouchement, les germes traversent le placenta, s'y multiplient en provoquant des lésions nodulaires disséminées (granulomes) dans toute la masse et atteignent le fœtus par voie sanguine. Celui-ci élimine ensuite les *Listeria* dans l'urine contaminant ainsi le liquide amniotique, puis se surinfecte en aspirant et en ingérant ce liquide amniotique riche en germes.

A l'autopsie de l'avorton, les mêmes lésions nodulaires parsèment les différents viscères particulièrement le foie, la rate et les surrénales.

###### *- La voie ascendante transmembranaire :*

La rupture prématurée des membranes est rare et *Listeria monocytogenes* est rarement isolée à partir de prélèvement cervico-vaginal, de ce fait, cette voie est relativement peu fréquente.

Le point de départ de cette contamination est cervico-vaginal et les *Listeria* pénètrent dans la cavité amniotique quel que soit l'état des membranes, rompues ou non. Si cette contamination est précoce, les germes se multiplient dans le liquide amniotique, l'enfant s'infecte par ingestion et/ou par aspiration de ce liquide et souffrira d'une méningite à la naissance.

- *La voie endométriale.*

Dans cette voie, il s'agit le plus souvent d'un foyer endométrial quiescent et réveillé lors de la grossesse. Les abcès volumineux, au centre nécrosé, caséimorphes, peuvent rester localisés, n'entraînent aucun symptôme chez la mère et l'enfant naît sain ; néanmoins, *Listeria monocytogenes* peut être retrouvé dans le méconium.

Toutefois, ces abcès peuvent se compliquer secondairement d'une placentite miliaire, infecter ainsi l'amnios et le cordon, entraînant alors une infection endométriale grave du fœtus.

L'origine endométriale de la contamination du fœtus représente le mécanisme le plus fréquent (82, 84).

- *La contamination pendant l'accouchement :*

Ce mode de contamination se caractérise par l'absence de lésions du placenta et des annexes associé au faible nombre de germes retrouvés chez l'enfant.

**La listériose maternelle** se traduit par un syndrome pseudogrippal, voire une discrète pneumopathie associée à des douleurs lombaires, une infection urinaire ou encore des leucorrhées. Ces symptômes surviennent le plus souvent vers le cinquième ou le sixième mois, et très souvent l'évolution de l'infection listérienne conduit la mère à une interruption de la grossesse. Il convient donc de rechercher ce germe devant toute symptomatologie infectieuse chez la femme enceinte (61, 67, 82, 84).

**La listériose du nouveau - né**, se manifeste soit précocement (avant le quatrième jour après la naissance), soit tardivement, après une période muette de 7 à 21 jours et dans les deux cas, il souffre d'un syndrome méningé, de meilleur pronostic s'il est traité tôt (82).

#### IV.2.2. Formes de l'adulte.

Sur le plan clinique, aucune symptomatologie particulière ne permet de distinguer une méningite à *Listeria monocytogenes* d'une autre inflammation méningée d'origine bactérienne. Ces formes s'expriment généralement par des méningites ou des méningo-encéphalites qui se traduisent tout d'abord par un état grippal ou par une simple rhinite, mais le plus souvent des signes annonciateurs et évocateurs s'installent. Les malades souffrent de violentes céphalées accompagnées d'une somnolence, voire d'un syndrome confusionnel, dans un état fébrile (82, 84).

Dans les cas de méningo-encéphalites , l'atteinte de l'encéphale se traduit par des paralysies diverses souvent accompagnées de manifestations bronchiques. La recherche du germe à l'examen direct du LCR peut être négative , mais la culture sera positive (84) .

Ces formes surviennent essentiellement chez des patients souffrant d'une affection sous-jacente immunodéprimante .

#### IV.3. Immunité.

A l'instar des autres bactéries, *Listeria monocytogenes* déclenche une réponse immunitaire thymo-dépendante sans intervention des anticorps dans le processus de guérison (24, 62, 66, 84).

Chez la souris, il est démontré qu'après la phase de croissance initiale des bactéries, apparaissent des lymphocytes T spécifiques. Ces derniers activent les monocytes sanguins d'origine médullaire dans les foyers infectieux. L'afflux de macrophages dans les tissus infectés, aboutit à la constitution de granulômes inflammatoires où les bactéries sont détruites.

Les convalescents gardent une résistance acquise de longue durée due à la présence de cellules T-mémoires(84),

#### IV.4.Portage

L'homme tout comme l'animal reste fréquemment porteur sain pendant de longs mois, même après traitement. Il s'agit d'un portage transitoire et sans signification clinique, seulement tous les deux peuvent aisément véhiculer ce germe (86).

Des animaux (bovins, ovins et poulets) ont également été trouvés porteurs sains au niveau des sécrétions nasales et des matières fécales (97).

Chez l'homme, des travaux similaires, notamment ceux de Seeliger (1961) et ceux de Gray et Killinger (1966) ont montré la présence de *Listeria monocytogenes* dans les matières fécales, la gorge et le pharynx d'individus sains. Ce portage varie de 0,6 % à 44 % des sujets examinés. Ces variations sont fonction des individus, de leur profession (éleveurs et vétérinaires) mais aussi des pays où sont effectuées les enquêtes (35, 61).

#### IV.5.Durée d'incubation.

La durée d'incubation de la maladie reste actuellement mal connue aussi bien chez l'homme que l'animal ; néanmoins, elle est estimée entre 4 jours et 3 à 4 semaines (46).

## V. Epidémiologie de la listériose.

### V.1. En médecine vétérinaire.

En médecine vétérinaire, les listérioses bovines sont apparues à partir des années 70 chez les ruminants en raison d'une alimentation à base d'ensilage de maïs : c'est pourquoi, elles reçurent le nom de "maladies de l'ensilage", (27, 31, 32, 65, 102).

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

Chez les bovins, les formes abortives sont plus fréquentes ; par contre, les formes méningo-encéphalitiques sont plus fréquentes chez les ovins et les caprins (27, 32 ).

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

A cela, s'ajoutent plusieurs paramètres, à savoir, le climat, la pluviométrie, la région géographique, les méthodes d'élevage (traditionnelles ou modernes), mais aussi et surtout la qualité des aliments distribués et l'environnement immédiat des animaux.

La distribution de foin ramassé et compacté en rouleaux mécaniquement, contenant des mottes de terre, favorisera l'apparition de cas endémiques.

L'affection sévit également dans les exploitations, mal protégées ou mal contrôlées sur le plan hygiénique, où des rats ou des oiseaux circulent librement et particulièrement la nuit (27, 32 ).

### V.2. En médecine humaine.

En médecine humaine, la listériose peut se présenter sous l'une des trois formes suivantes : (31, 57, 58, 82).

- les cas sporadiques,
- les infections nosocomiales, rares, essentiellement caractérisées par des infections croisées entre nouveaux-nés,
- les épidémies.

*Dans les cas sporadiques*, elle est souvent considérée comme un problème spécifique des pays industrialisés de par la grande variété de denrées alimentaires mises à la disposition des consommateurs, mais elle n'épargne en aucun cas les pays en voie de développement.

*Les infections nosocomiales* sont essentiellement représentées par les contaminations croisées survenant dans les services de maternité. Thermomètres, sondes d'aspiration ou encore incubateurs ont été suspectés dans certains cas, comme étant le principal véhicule de transmission de la maladie.

*Dans le cas des épidémies*, grâce à l'étude des cas témoins et à une meilleure caractérisation des souches, notamment grâce à la lysotypie, il est apparu de plus en plus évident que des aliments contaminés étaient à l'origine de la contamination humaine.

A travers le monde, le nombre de cas recensés a permis de mettre en évidence des aliments à l'origine de la contamination humaine et donc de classer cette affection parmi les infections d'origine alimentaire (82, 83, 84).

## Chapitre VI : Mode de transmission.

Aujourd'hui, il est clairement reconnu que la consommation d'aliments contaminés constitue le principal mode de transmission de *Listeria monocytogenes*, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.

### VI.1. En médecine vétérinaire.

En médecine vétérinaire, de nombreux travaux ont montré la multiplication active des *Listeria* dans les ensilages mal préparés ( pH trop élevé , broyage trop grossier des végétaux , aérobiose , présence de terre , stockage en semi-enterré dans les sols , lessivages par des pluies , mauvaise protection par des bâches abîmées ou récupérées ( 32, 105, 106 ). Certains auteurs n'hésitent pas à rapporter que l'utilisation d'ensilage multiplie le risque de 20 à 40 fois d'avoir la listériose pour un troupeau (106).

Seulement, deux situations peuvent se présenter :

- D'une part, **les animaux dont l'état physiologique est bon** pourront ingérer des quantités importantes de *Listeria* sans manifester de signes cliniques. Cependant, ils excréteront de façon plus ou moins importante les germes, entre autres dans les fèces et le lait. Ainsi, les végétaux, entrant dans la composition des ensilages, pourront être contaminés par des épandages d'excréments. L'animal porteur sain devient alors un dangereux multiplicateur de germes, enrichissant donc le milieu extérieur. La contamination de l'environnement sera telle, que la transmission à d'autres animaux sera imminente (32, 62 ).
- D'autre part, et pour des raisons diverses : gestation, maladies intercurrentes, stress, alimentation déséquilibrée, carences, accidents et autres, **l'équilibre physiologique peut être rompu**. Les animaux vont alors présenter une baisse de l'immunité et l'ingestion de quantités importantes de *Listeria* va faire apparaître des signes cliniques.

La maladie pourra être sporadique dans un troupeau, mais lors de contamination massive, l'affection peut devenir enzootique et un grand nombre d'animaux pourront présenter diverses formes cliniques de listérioses à savoir : avortements, méningo-encéphalites, septicémies, conjonctivites.

Pour les animaux producteurs de lait; les litières, les trayons, les manchons trayeurs et par conséquent le lait seront aisément contaminés (32, 46).

## VI.2. En médecine humaine.

En médecine humaine, l'homme se contamine le plus souvent par l'ingestion de laits crus contaminés ou de fromages faits à base de laits crus contaminés. Néanmoins, d'autres denrées alimentaires ont été incriminées dans la transmission de la maladie causant ainsi des épidémies dont la majorité est répertoriée dans le tableau III ci - après.

Tableau III : Principales épidémies de Listérioses humaines répertoriées dans le monde en fonction de leur localisation, des denrées en cause, des années et du nombre de cas (62).

Localisation	Année	Nb de cas	Origine
Halle (Allemagne)	1949-1957	100	Lait cru , Lait acide , crème
Iéna (Allemagne)	1954	26	Lait cru
Union soviétique	1956	19	Porc , souris
Brème (Allemagne)	1960-1961	81	
Halle (Allemagne)	1956	279	
Auckland (Nlle-Zéland)	1969	13	
Anjou ( France)	1975-1976	162	
Johannesburg	1977-1978	14	
Australie	1978-1979	12	Végétaux crus
Massachussets (USA)	1979	20	Végétaux crus , lait cru
Auckland	1979-1980	10	
Auckland	1980	22	Poisson cru , crustacé
Angleterre	1981	11	Crème
Slovaquie	1981	49	
Canada	1981	41	Salade de choux
Christchurch (NlleZéland)	1981-1982	18	
Houston (Texas )	1983	10	
Allemagne de l'Ouest)	1983	25	
Massachussets (USA)	1983	49	Lait pasteurisé
Vaud (Suisse)	1983-1987	122	Vacherin Mont d'or
Los Angeles	1985	142	Fromage mexicain
Danemark	1985-1987	35	
Linz (Autriche)	1986	20	Lait cru , végétaux
Los Angeles	1986-1987	37	Œuf cru
Los Angeles	1987	11	Beurre
Angleterre	1987	23	
France	1999-2000	47et plus	Fromages , Rillettes de porc

Ce tableau illustre bien le fait qu'il s'agit de denrées alimentaires diverses d'une part, et ne concerne que les pays industrialisés d'autre part. La question de savoir si des épidémies de listériose sont passées inaperçues dans d'autres pays ou ne savent – ils pas les rechercher, reste toujours posée.



## Chapitre VII : Dose infectante.

Que ce soit en médecine humaine ou vétérinaire, la dose minimale infectante est très difficile à définir car elle est tributaire de l'état physiologique des consommateurs, donc de leurs profils. En effet, la teneur maximale de *Listeria* pouvant être à l'origine de la maladie chez des individus adultes et sains, n'est pas forcément la même pour les sujets immunodéprimés. Elle reste donc dépendante des groupes à risques. (31, 46, 79).

Par ailleurs, si on essaie d'être de plus en plus vigilant en ce qui concerne l'absence de *Listeria* dans les aliments consommés par l'homme, l'animal, en revanche, l'herbivore en particulier, est directement au contact des bactéries environnementales par l'herbe qu'il ingère.

*Listeria* est ubiquiste; elle contamine la terre, l'herbe, le sol, les murs et les plafonds des étables et des usines agro-alimentaires, les chambres froides et les parois de nos réfrigérateurs.

En bref, comment éliminer des aliments, une bactérie aussi présente et aussi résistante dans notre environnement ?

Plus en aval, dans la chaîne alimentaire, l'accent a été mis sur la propreté des manipulations tout au long de la chaîne alimentaire, de l'étable au produit fini. Mais, de par le caractère ubiquitaire du germe, il semble aujourd'hui, illusoire de vouloir éradiquer les *Listeria* et donc les listérioses (21).

En somme, la question de la teneur minimale de *Listeria* admise dans nos aliments, autrement dit, la dose infectante reste toujours posée. Certains organismes internationaux ont tenté de proposer des solutions, mais ces dernières demeurent désormais, toujours en état de discussion (21, 39).

- Primo, doit - on suivre les normes de la FDA qui préconise zéro germes pour 25 grammes de fromage ou 25 ml de lait ?
- Secundo, doit - on continuer à accepter la tolérance maximale de 100 germes par gramme ou par millilitre de produit proposée par le Conseil Supérieur d'Hygiène de France, tout en sachant que certains immunodéprimés peuvent être sensibles à quelques unités infectieuses ?
- Tertio, doit - on admettre l'absence de *Listeria* dans tout produit frais, tout en sachant que l'exigence « zéro *Listeria* » condamne irrémédiablement certains pans de l'industrie laitière mise le plus souvent, dans l'impossibilité de répondre convenablement à cette norme .

Ces questions semble-t-il, reçoivent un début de réponse puisque l'AFSSA propose la norme européenne « zéro Listeria » chez le fabricant, dans les contrôles bactériologiques de tous les produits frais à risques ( produits laitiers , produits de charcuterie , produits de la mer fumés ) et non pas uniquement sur les produits laitiers qui figuraient seuls dans la réglementation FDA (31, 33).

Toujours en France, la tolérance d'une certaine quantité de Listeria ( inférieure à 100 germes par gramme de produit ) pour l'aliment analysé en fin de péremption étant laissé à l'appréciation du vétérinaire inspecteur départemental, une lourde responsabilité ! (39, 64 ).

Comme on le voit, le problème de la listériose, associé à la médiatisation des accidents humains par le biais du lait cru de vache, n'est pas facile à gérer.

En Algérie, l'Arrêté interministériel n°35 du 27 Mai 1998 (74), fixant les critères microbiologiques de certaines denrées alimentaires et notamment des laits crus, n'en parle pas du tout. Cependant, compte tenu de la situation épidémiologique mondiale, il a été proposé et retenu pour le prochain arrêté, l'absence de Listeria monocytogenes dans 25 millilitre de lait cru. Cette norme a même été étendue à un grand nombre de produits laitiers frais, à des produits carnés ainsi qu'aux produits de la pêche fumés.

## Chapitre VIII : Ecologie des Listeria.

*Listeria monocytogenes* est une bactérie mésophile ubiquitaire que l'on retrouve aussi bien chez les porteurs sains, qu'au niveau du milieu extérieur : sol, plantes, terre, végétation, ensilages, eaux.

*Listeria monocytogenes* est également un contaminant du lait cru, c'est pourquoi, la maîtrise de ce risque sanitaire nécessite une bonne connaissance des différentes sources de contamination dans l'exploitation laitière.

### Origines de la contamination du lait cru

La filière laitière est particulièrement vigilante dans la production d'un lait cru indemne de bactéries et plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.

De nombreux travaux ont permis d'étudier le mode de transmission : de la bactérie pathogène au lait cru (97).

La détermination du cycle de contamination de *Listeria monocytogenes* dans l'exploitation laitière est obligatoire pour les deux raisons suivantes :

- d'une part, maîtriser l'hygiène de la production laitière,
- d'autre part , définir les moyens de lutte.

Le cycle de contamination du lait cru par *Listeria monocytogenes*, inclut les étapes qui figurent dans le schéma<sup>o</sup>1 ci - après .

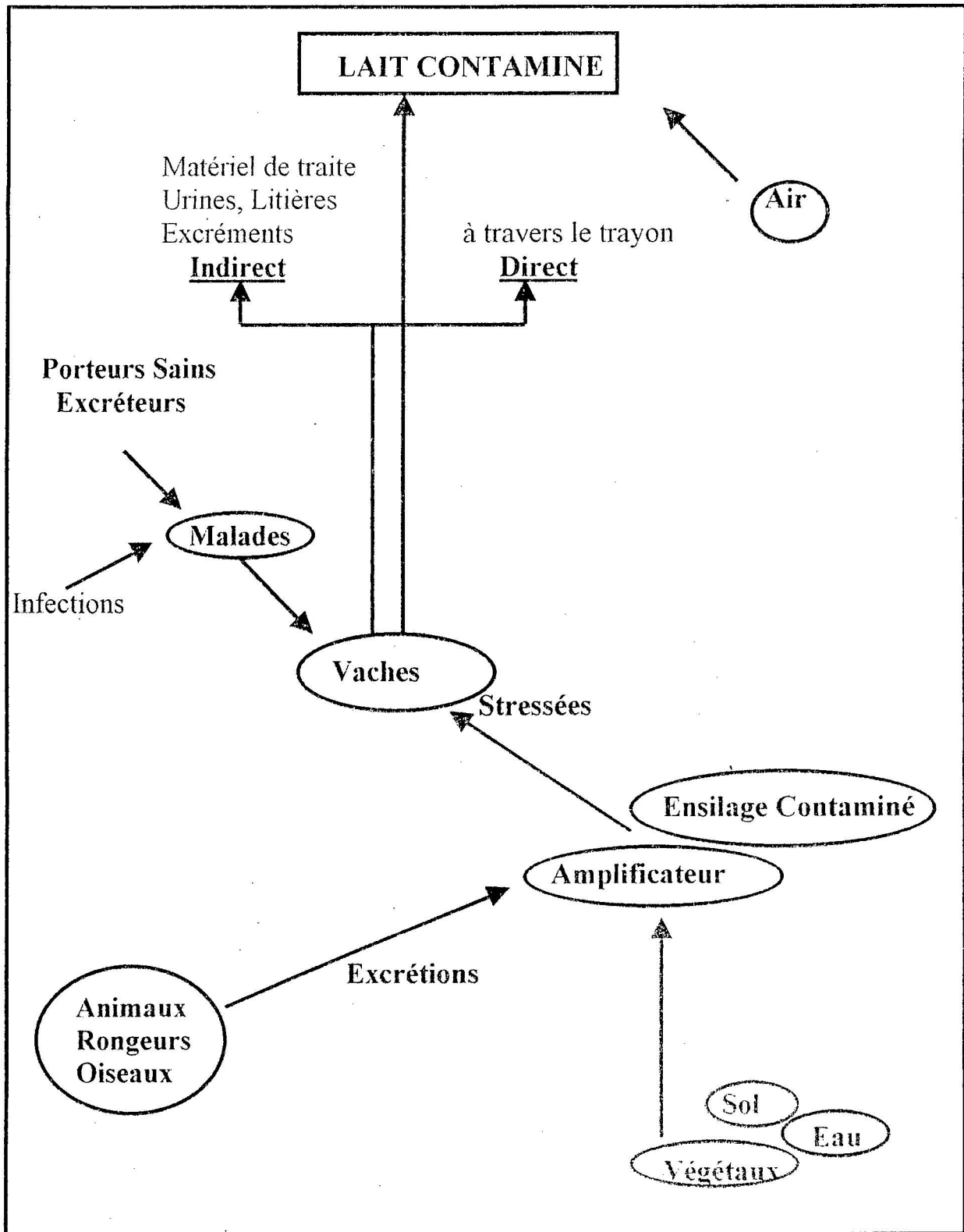


Schéma n°1 : Cycle de contamination du lait ( 97) .

### VIII.1.Le lait cru.

La contamination du lait cru peut avoir lieu par :

- une contamination interne et directe : dans ce cas, la bactérie peut traverser le tractus intestinal de l'animal, passer dans la circulation sanguine et contaminer le lait au moment de son excrétion, comme tout autre micro-organisme. Ce cas rare, est difficile à mettre en évidence car le protocole est lourd et onéreux, car il nécessite une investigation minutieuse vache par vache.
- une contamination externe et indirecte : celle ci, viendra de l'environnement contaminé en *Listeria* à savoir le paillage, les matières fécales, les trayons souillés de la vache, le matériel de traite mal nettoyé et mal désinfecté et ce, pendant la traite ou juste après. Cette voie externe semble la principale source de contamination du lait cru à la ferme.  
Des études effectuées aux USA sur 650 échantillons de lait cru et au Canada sur 315 échantillons de lait cru, ont montré que respectivement 1,3 et 5,4 % des tank à lait étaient contaminés par *Listeria monocytogenes* (97).

### VIII.2.Le troupeau laitier.

Les animaux ingérant des aliments contaminés deviendront des porteurs de germes.

A ce moment, deux éventualités se présentent :

- **l'hôte est résistant** et les souches de *Listeria* ne manifestent aucun pouvoir pathogène ; l'animal est alors « un porteur sain » : *Listeria* se développe dans l'organisme sans qu'il en souffre. Les bactéries seront éliminées dans les excréments et vont enrichir l'environnement immédiat (les litières, le sol).
- **la résistance de l'hôte n'est pas suffisante** et l'animal va présenter les symptômes cliniques de la maladie.

L'infection sévit chez les animaux de tous les âges, mais elle est plus grave pour les nouveaux - nés et les jeunes animaux.

Le troupeau laitier atteint de listériose contamine l'étable par les matières fécales, les urines, l'avorton et l'écoulement utérin.

Les animaux sont plus particulièrement sensibles à la contamination à la fin de l'hiver et au printemps, les principales raisons sont les suivantes :

- une alimentation trop riche en ensilage peut à la fois augmenter la sensibilité de l'hôte mais également peut lui proposer un contact fréquent avec *Listeria*. Des études ont démontré la corrélation entre le lait cru contaminé en *Listeria* et la consommation préalable d'ensilage contaminé (97). La présence de *Listeria* dans l'ensilage, et donc dans les matières fécales, multiplie le risque de la contamination du lait cru à la récolte,
- les changements d'habitat et d'alimentation ; en automne et en hiver les animaux sont nourris par l'ensilage dans l'étable, alors qu'au printemps les animaux, dans certaines régions au moins, sortent au pâturage,
- la concentration d'animaux en gestation qui, de ce fait, sont affaiblis. De plus, l'accumulation de délivrances dans les étables constitue une source majeure de contamination,
- le manque d'espace,
- la mauvaise aération,
- le manque d'hygiène et de nettoyage,
- le manque d'eau,
- et le manque de soins vétérinaires.

Le rôle de l'animal contaminé dans les infections humaines n'est pas à négliger : des éleveurs et des vétérinaires ont contracté la listériose à l'occasion de contacts directs avec des animaux, lorsque les mesures d'hygiène traditionnelles n'avaient pas été respectées. Cette forme de la maladie se traduit le plus souvent par une dermatose au niveau des bras et des avant bras (82, 86).

### VIII.3.L'ensilage.

Les fourrages destinés aux vaches laitières sous forme d'ensilage, dans lesquels la terre a été entraînée lors de la récolte, peuvent contaminer les silos en *Listeria*. L'ensilage constitue donc, un milieu propice à la multiplication de la bactérie pathogène, notamment dans les zones du silo où le pH est supérieur à 5. En dessous de cette valeur, *Listeria* ne se multipliera plus aisément mais arrivera à survivre pendant plus d'une année.

Une étude menée par Aerial (97) en 1990 – 1991, a mis en évidence une importante contamination de **l'ensilage de maïs** par des bactéries du genre *Listeria*. En effet, le nombre de *Listeria* présent dans les silos variait entre  $10^2$  UFC/g et  $10^6$  UFC/g. Son étude a donc fourni les résultats suivants :

- lors de la première période d'ensilage en 1990, 41% des prélèvements effectués sur 203 échantillons au total, étaient contaminés par l'une des espèces du genre *Listeria*.
- durant la deuxième période, en 1991, seulement 30% des prélèvements effectués sur les 203 échantillons au total, étaient contaminés par l'une des espèces du genre *Listeria*.

La présence de *Listeria monocytogenes* était respectivement de 17% et de 7%. *Listeria innocua*, d'écologie proche de l'espèce pathogène, représentait 24% pour la première période et 11% pour la seconde.

**L'ensilage d'herbe** a été indemne de *Listeria* au cours des deux années de travail.

Ce résultat est surprenant, car selon la littérature le risque de contamination est similaire pour les deux types d'ensilage.

Les sites sensibles dans les silos d'ensilage de maïs ont été identifiés et sont indiqués sur le schéma n°2 ci - après.

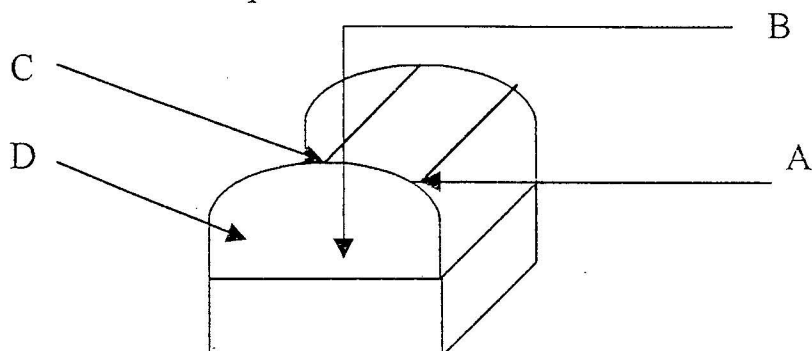


Schéma n°2 : Sites sensibles à la contamination par *Listeria monocytogenes* d'un silo.

Légende : A : côté du silo au sommet, B : centre du silo 30 à 150 cm de profondeur, C : centre au sommet, D : côté à 30 cm de profondeur.

Les zones A et D sont les principaux sites à risques en *Listeria*.  
Les zones B et C sont moins souvent impliqués.

Le schéma n°3 nous indique la répartition de la contamination en *Listeria* (dont *Listeria monocytogenes*) dans les quatre sites sensibles des silos étudiés en 1990.

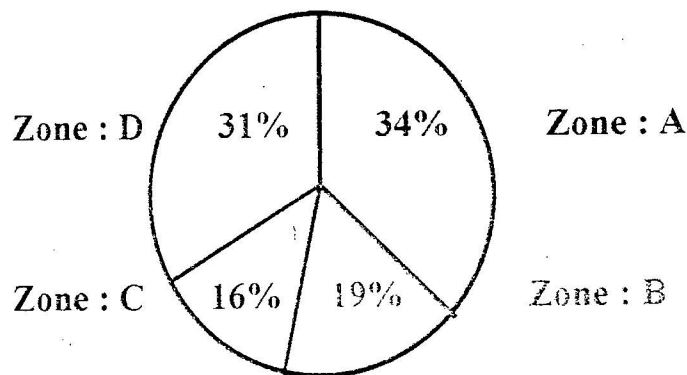


Schéma n°3 : Répartition de la contamination en *Listeria monocytogenes* dans les quatre sites sensibles (97).

La conservation de l'ensilage dans les sites A et D est plus délicate. Le tassement insuffisant ou la présence d'oxygène due à un manque d'étanchéité du silo sont fréquents. Les conditions d'anaérobiose sont alors imparfaites et les germes aérobies indésirables se développent, entravant l'acidification souhaitée du milieu par les flores lactiques. L'augmentation du pH de l'ensilage dans ces zones est plus exactement dû à la consommation de l'acide lactique et à la production d'ammoniac par les bactéries aérobies. Ces pH élevés, pouvant dépasser la valeur de 6,00, sont propices au développement de *Listeria*.

A ce niveau de pH, d'autres facteurs inhibant *Listeria* et produits par les flores lactiques tels que les acides, le peroxyde d'hydrogène et les bactériocines sont également inopérants.

Par ailleurs, une relation étroite entre le pH de l'ensilage de maïs et la présence ou l'absence de *Listeria* a pu être déterminée. Il a été constaté une augmentation progressive du nombre d'échantillons contaminés en *Listeria* lorsque le pH s'accroît.

Pour exemple, lors de la première année d'étude, la répartition a été la suivante :

- 17 % des échantillons prélevés à pH inférieur à 4,00 présentent le genre *Listeria*,
- 52 % des échantillons prélevés à pH compris entre 4,00 et 4,99 sont contaminés par *Listeria*,
- 54 % des échantillons prélevés à pH compris entre 5,00 et 5,99 sont contaminés par *Listeria*,
- 72 % des échantillons prélevés à pH supérieur à 6,00 sont contaminés.



Ces résultats sont conformes à l'écologie de *Listeria*, à savoir un développement de la bactérie à un pH compris entre 5,00 et 7,50 avec un maximum à pH 7,00 à 7,50.

Les ensilages bien conservés suite à une acidification correcte ont un pH compris entre 3,50 et 4,00 ; ce dernier devient alors inhibiteur de *Listeria*.

Dans ce cas, la bactérie pathogène ne survit généralement pas plus d'une ou de deux semaines.

#### VIII.4. La terre et le sol.

Dés 1960, Gray a isolé des *Listeria* à partir d'ensilage de maïs, ces travaux ont été confirmés par des isolements à partir de plantes, de fourrage, de terre, de boues, de poussières, d'ensilages d'herbes et à partir d'eaux de rivière (16, 17).

La fréquence élevée avec laquelle on isole ce germe du sol et des plantes, la capacité des *Listeria* de se multiplier à basse température, la possibilité de survivre pendant de longues périodes dans le sol, impliquent une existence saprophytique certaine (19, 97).

L'environnement plante – sol constitue donc véritablement un réservoir. De ce fait, on admet que les végétaux peuvent contaminer les animaux.

#### VIII.5. Les autres alimentations animales.

D'autres vecteurs de *Listeria* tels que la paille, le foin, les pulpes de betteraves et l'eau peuvent être cités.

Cependant, lors de l'étude menée par Aerial, le genre *Listeria* n'a jamais été isolé dans les prélèvements effectués dans les milieux énumérés précédemment.

## Chapitre IX : Bactériologie.

### IX.1. Structure et Morphologie.

*Listeria monocytogenes* est un petit bacille à Gram positif de 0,5  $\mu\text{m}$  à 2  $\mu\text{m}$  de long sur 0,4 à 0,5  $\mu\text{m}$  aux extrémités arrondies, asporulé et non capsulé.



Figure 1 : Aspect des *Listeria* au Gram.

Peu ou pas mobile à 37°C, *Listeria monocytogenes* est toujours mobile à 22-25°C.

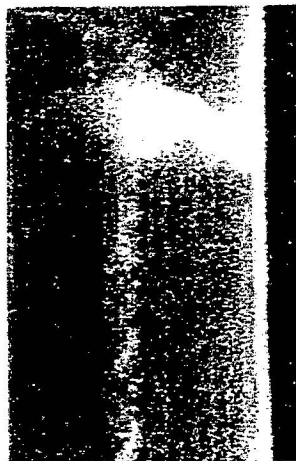


Figure 2 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose mobilité à 22 °C.

Cette particularité est un caractère important dans le diagnostic bactériologique de ce germe. Cette mobilité est due à la présence de 1 à 4 flagelles à implantation péritriche (9, 15, 66).

Pour l'étude de la mobilité, deux bouillons nutritifs sont ensemencés et incubés l'un à 20-25°C, l'autre à 35-37°C pendant environ 4 heures. A 25°C *Listeria monocytogenes* présente une mobilité caractéristique (la bactérie donne l'impression de tourner sur elle-même ) alors qu'elle est immobile à 37°C. Ce test simple doit être effectué devant toute suspicion de listériose (cf. schéma n°4 ci-après).

Par ailleurs, en gélose mobilité incubée à 22°C, *Listeria* donne une image typique de sapin renversé (cf. figure 2), témoignant de son caractère microaérophile.

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

Ces bactéries se regroupent parfois en amas, en palissades et pourront évoquer des bactéries du genre corynebactérium.

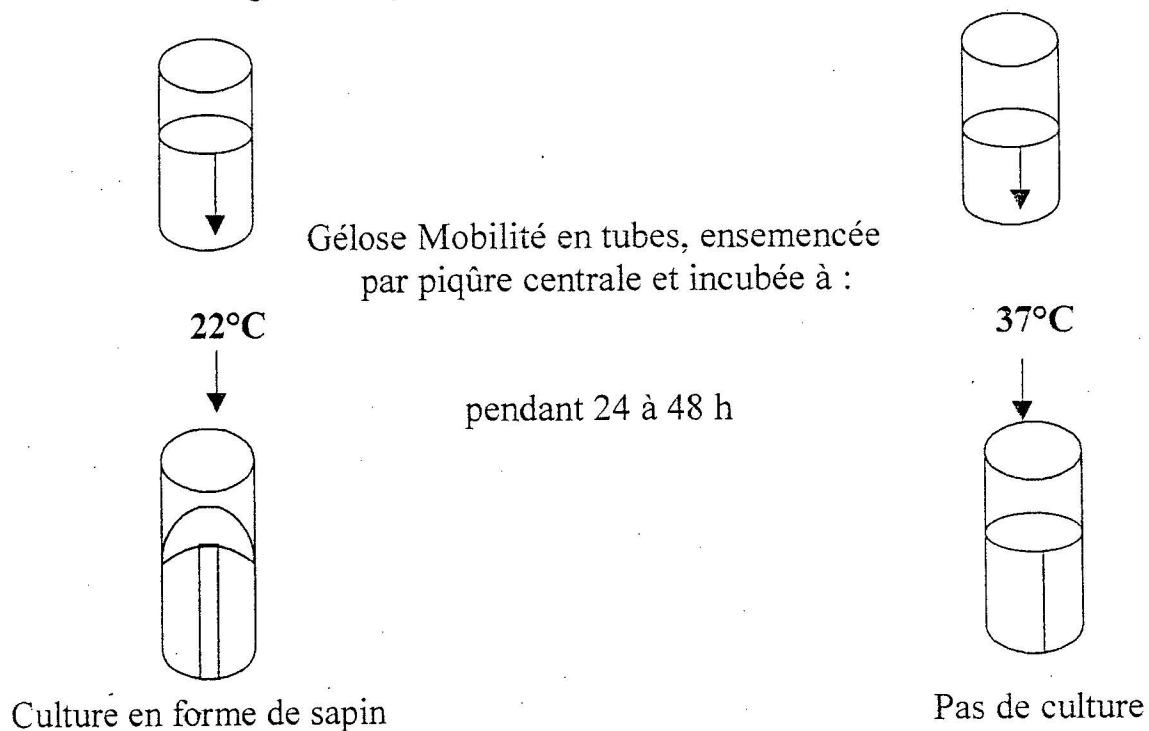


Schéma n°4 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose mobilité.

### IX.2.Culture et croissance.

C'est un germe aéro- anaérobie facultatif qui pousse bien sur les milieux usuels. L'adjonction de glucose au milieu à 0,5 % ou l'utilisation de milieux à base de tryptose favorisent cette culture (15, 36, 66).

Sur gélose nutritive, de petites colonies, moins de 1 mm de diamètre, lisses à bords réguliers et transparents, apparaissent en 24 heures à 37°C.

Examinées en transillumination oblique selon la technique d'Henry, elles ont une coloration bleu-vert très caractéristique (84, 87).

Dans les vieilles cultures, les colonies s'élargissent et s'opacifient. Les colonies "R" sont plus larges, plates et ternes.

En bouillon glucosé, un trouble intense et homogène apparaît en 18 heures.

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

*Listeria monocytogenes* est également hémolytique pour les globules rouges de lapin et d'homme, ce caractère est intimement lié à la pathogénicité des souches(82, 85, 87).

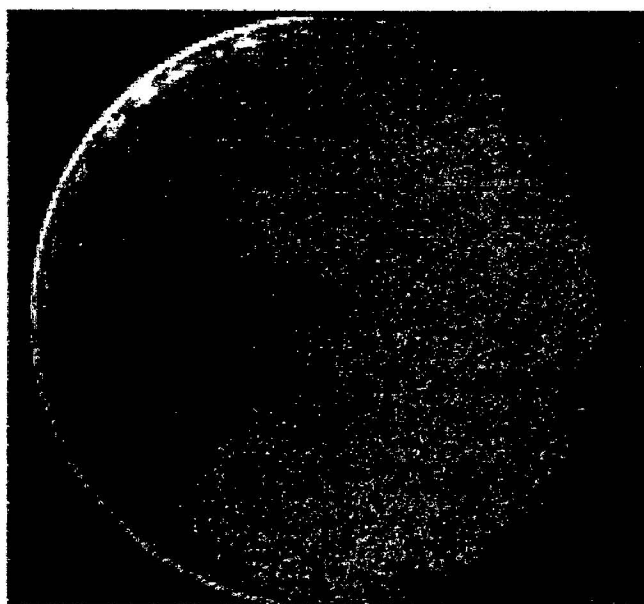


Figure 3 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose au sang.

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

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

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

*Listeria monocytogenes* cultive bien à un pH neutre ou légèrement alcalin (optimum : 7,2 - 7,6) comme on vient de le voir dans la partie écologie.

La croissance à +4°C est une particularité exceptionnelle de *Listeria monocytogenes*, elle était d'ailleurs utilisée autrefois, comme procédé d'enrichissement.

La résistance de *Listeria monocytogenes* aux agents physiques et chimiques est étonnante pour un germe non sporulé : les cultures restent viables plusieurs mois à la température du laboratoire, et plusieurs années à +4°C (17).

Elles résistent à un chauffage de 55°C pendant 30 minutes, survivent à l'action des milieux hostiles contenant 10% de NaCl, 40% de bile, 0,5% de Téllurite de potassium (17).

### IX.3. Caractères biochimiques.

Les principaux caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont consignés dans le tableau IV, ci-après :

Tableau IV : Principaux caractères biochimiques du genre *Listeria* (62, 66 ).

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

Les principaux caractères biochimiques correspondants aux différentes espèces de *Listeria* et *Jonesia denitrificans* figurent dans le tableau V (62).

Tableau V : Caractères biochimiques différentiels des espèces de *Listeria* (62).

Caractéristiques	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>Listeria denitrificans</i>
Bâtonnets irréguliers	-	-	-	-	-	-	-	+
β-hémolyse	+	-	+	-	-	-	-	-
Camp-test								
- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-
- <i>Rhodococcus equi</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
Production d'acide à partir de :								
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Listeria-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextrine	±	-	-	-	-	+	+	+
Galactose	±	-	-	-	±	+	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+	+	-
Glycogène	-	-	-	-	-	-	-	+
Lactose	±	+	-	-	+	+	+	+
D-Lyxose	-	-	-	-	-	+	+	-
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Mélezitose	±	±	-	-	±	-	-	-
Mélibiose	-	-	-	-	±	-	-	-
&-Méthyl-D-glucoside	+	+	-	+	+	+	+	-
&-Méthyl-D-mannoside	+	+	-	+	-	-	-	-
Listeria-Rhamnose	+	±	-	±	-	-	±	-
Sorbitol	±	-	-	-	-	-	-	-
Amidon soluble	-	-	-	-	-	+	+	-
Saccharose	-	±	-	-	±	-	-	+
D-xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-tagatose	±	±	±	±	-	-	-	-
D-turanose	±	±	±	±	±	-	+	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Hydrolyse de :								
Urée	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	-	-	-	-	-	+
Hippurate	+	+	-	-	+	-	-	-
Amidon	±	±	-	-	-	-	-	+
Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+
Lécithinase	±	±	-	-	+	-	-	-
Phosphatase acide ( APIZym )	+	+	+	+	+	-	-	-
Phosphoamidase ( APIZym )	+	+	+	+	+	-	-	-
Réduction de NO <sub>3</sub> en NO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	+	+
Pathogénicité pour la souris	+	-	-	-	+	-	-	+
G + C ( % mol )	37-39	36-38	36	36	37-38	41-42	41-42	56-58

Les caractères différentiels entre *Listeria* et les bactéries proches, figurent dans le tableau VI.

Tableau VI : Caractères différentiels entre *Listeria* et les bactéries proches (62).

	<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
Mobilité à 25°C	+	-	-	- (+)
Catalase	+	-	+	-
Esculine	+	-	-	+
H <sub>2</sub> S	-	+	-	-
Lait tournesolé				
- coagulation	-	-	-	+
- réduction	+	-	-	+
Corpuscules métachromatiques	-	-	+	-
a) immobile ou peu à 37°C				
b) réaction positive en 2 heures				

Les caractères des sept genres composant le groupe des bacilles à Gram positif, proches de *Listeria* figurent dans le tableau VII.

Tableau VII : caractères des sept genres composant le groupe des bacilles à Gram positif, proches de *Listeria*. (62).

Morphologie	Genre	Catalase	Type respiratoire	Mobilité	Habitat
Bacilles droits	<i>Lactobacillus</i>	-	AAF*	-	Produits fermentés Non pathogènes
Bacilles fins, souvent en filaments	<i>Erysipelothrix</i>	-	AAF*	-	Rouget de Porc : pathogène
Bacilles fins, souvent en filaments	<i>Brochothrix</i>	+	AAF*	-	Produits carnés : non pathogènes
Bacilles courts, souvent en courtes chaînettes et filaments	<i>Listeria</i>	+	AAF*	+ 20-25°C	Saprophytes : pathogènes chez l'homme et l'animal
Bacilles en chaînettes, coccoïdes dans les cellules âgées	<i>Kurthia</i>	+	AS**	+	Intestin des animaux de la ferme
Bacilles courts en chaînettes	<i>Caryophanon</i>	+	AS**	+	Intestin de la vache Non pathogènes
Bacilles courts, souvent par paires	<i>Renibacterium</i>	+	AS**	-	Pathogènes du poisson.
* AAF : Aéro - anaérobie facultatif.					
** AS : Aérobie strict.					

#### IX.4. Evolution des techniques de recherche des Listeria.

Depuis le début des années 1980, le rôle des aliments et particulièrement du lait de vache a été mis en évidence dans la contamination de l'industrie laitière et par conséquent dans la contamination humaine lors de flambées épidémiques de listériose.

A cet effet, plusieurs méthodes de détection ont été proposées et développées de façon à isoler le plus rapidement possible le groupe génomique *monocytogenes*, responsable des principaux cas de listériose. En somme, il s'agit de méthodes bactériologiques, immunochimiques, immunophysiques, physiques et des méthodes de biologie moléculaire (3, 9, 28, 30, 35, 62).

##### IX.4.1. Méthodes bactériologiques.

En effet, dès 1966, la première méthode bactériologique proposée, reposait sur le caractère psychrotrophe des *Listeria* et supposait donc, un enrichissement sélectif de trois à quatre semaines à + 4°C. Cette étape a été jugée très longue, car elle ne répondait pas aux exigences des délais de réponse, déjà posés.

Depuis beaucoup de progrès ont été réalisés de façon à optimiser la sélectivité de la culture et le temps nécessaire à la détection de *Listeria monocytogenes* est passé de trois à quatre semaines, à 4 voire 7 jours.

De plus, la connaissance de la résistance de *Listeria* à de nombreux inhibiteurs a permis d'évoluer vers des techniques d'enrichissement plus rapides de l'ordre de 2 à 3 jours à 30 et/ou 37°C.

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

C'est ainsi qu'en Décembre 1993, l'AFNOR a proposé une méthode expérimentale, qu'elle a ensuite homologuée et référencée en Août 1997 (73).

En 1998, l'organisation internationale de standardisation (ISO) a proposée également une méthode de référence portant le numéro EN ISO 11290-1, homologuée et validée(72). Cette dernière repose sur les mêmes principes que la méthode AFNOR.

Plus tard, en juin 1998, Laboratoires Sanofi Diagnostic Pasteur font part d'une nouvelle méthode bactériologique appelée : RapidL'mono. Cette méthode a également été homologuée et validée par l'AFNOR comme méthode alternative et est inscrite aujourd'hui sous le numéro SDP-07/04-09/98 (37).



Le principe du milieu RapidL'mono repose sur la détection spécifique d'une phospholipase de *Listeria monocytogenes* et sur l'aptitude de cette espèce à métaboliser le xylose (37).

Après 24 à 48 h d'incubation, *Listeria monocytogenes* forme des colonies caractéristiques bleu franc sans halo jaune. Les colonies formées par les autres espèces de *Listeria* sont blanches avec ou sans halo jaune (cf. schéma n°5 ci-après).

Il faut alors noter la particularité de l'espèce *Listeria ivanovii* qui se présente sous forme de colonies bleu-vert avec un halo jaune due à son caractère xylose positif. Le supplément sélectif contenu dans le milieu RapidL'mono, permet l'inhibition plus ou moins totale de la majorité des flores interférentes.

Ainsi, par ses performances, RapidL'mono est le premier milieu de culture **chromogène** qui permet une identification rapide et directe de *Listeria monocytogenes*, en 24 à 48 heures, après préparation des échantillons conformément à la norme AFNOR, à savoir enrichissement en bouillon Fraser au demi, pendant 24 h puis en bouillon Fraser 1, pendant 48 heures (37).

A côté, de ces trois méthodes bactériologiques, et devant la crainte de voir surgir encore de nouvelles épidémies tant en élevage bovin qu'en industrie laitière, se sont développées plusieurs techniques bactériologiques, traduisant ainsi une concurrence entre les différentes firmes. Cependant les phases d'enrichissement, d'isolement et d'identification biochimique, restent incontournables.

Le tableau VIII ci - après résume les principales méthodes proposées par les principales firmes.

Tableau VIII : Principales méthodes bactériologiques.

Méthodes	AFNOR V08-055	FIL	FDA	USDA
Applications	Tous les aliments	Laits et Produits laitiers	Laits et produits laitiers	Viandes et produits carnés
Enrichissement primaire	Fraser 24h, 30°C	LEB 48 h, 30°C	LEB 24 à 48 h, 30°C	UVM 24 h, 30°C
Enrichissement secondaire	Fraser 1/2 24 à 48h, 37°C	-	-	Fraser 24 h, 30°C
Isolement	Palcam 24 à 48h, 37°C	Oxford 48 h, 37°C	MMA 48 h, 30°C	Oxford modifié 24 h, 30°C
Rapidité	2 à 5 jours	4 jours	2 à 4 jours	3 à 4 jours

FIL : Fédération Internationale Laitière; FDA : Food and Drug Administration; USDA : United States Drug Administration; LEB : Listeria Enrichissement Broth; UVM : Milieu proposé par l'Université du Vermont; MMA : Milieu Modifié de Mac Bride;

En conclusion, les méthodes bactériologiques requièrent, selon la contamination initiale des échantillons de laits d'une part, et l'état physiologique des *Listeria*, d'autre part, au minimum 4 à 7 jours pour obtenir un résultat positif confirmé avec identification de l'espèce.

La sensibilité de ces méthodes est de 1 à 10 bactéries dans 25 ml de lait.

La récupération des cellules de *Listeria* ayant subi un stress dépend de la qualité du premier bouillon d'enrichissement, puisque aucune étape de pré-enrichissement n'est réalisée dans les protocoles les plus courants.

En ce qui concerne la spécificité, les différents éléments sélecteurs présents dans les milieux d'enrichissement et d'isolement ne permettent pas d'inhiber la totalité de la flore compétitive, une confirmation biochimique est quelque fois obligatoire. Cependant l'aspect très caractéristique des colonies de *Listeria* sur la gélose Palcam, utilisé dans la méthode AFNOR, pallient ce problème.

En ce qui concerne le dénombrement des *Listeria*, deux méthodes bactériologiques peuvent être utilisées :

- la méthode FDA avec la technique en tubes multiples en tenant compte du nombre le plus probable (NPP),
- la méthode par étalement direct sur gélose Palcam ou Oxford.

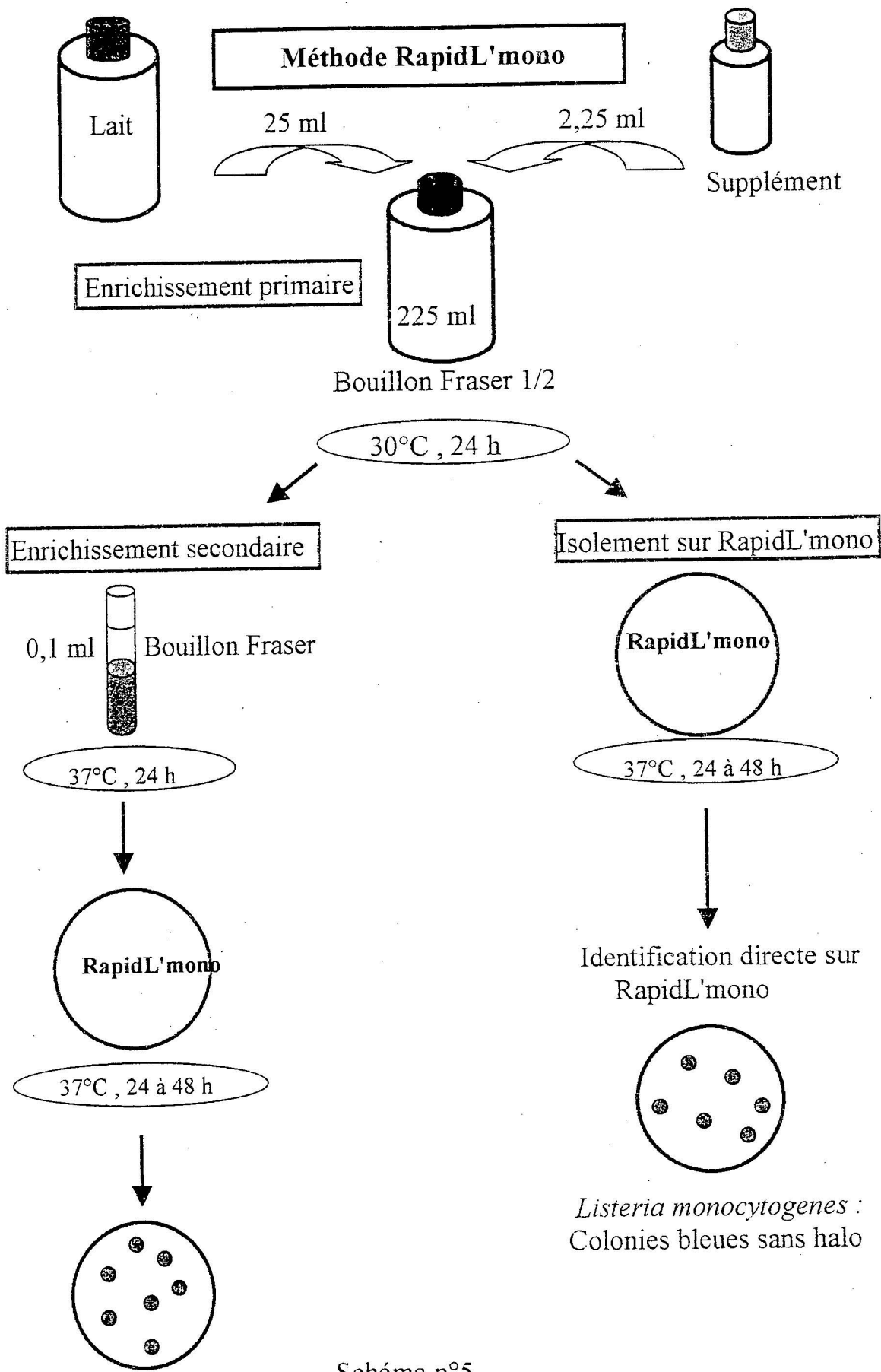


Schéma n°5

#### IX.4.2.Méthodes immunochimiques.

Ces méthodes de détection sont fondées sur la reconnaissance d'antigènes de *Listeria* à l'aide d'anticorps spécifiques de l'espèce ou plus récemment du groupe génomique *Listeria monocytogenes* (3, 28, 30 ).

Le complexe antigène - anticorps est mis en évidence à l'aide d'une réaction chimique avec un substrat chromogène ou fluorogène.

Parmi ces techniques, on peut citer :

- la méthode ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay ),
- le système VIDAS .

La sensibilité générale de ces techniques est comparable à celle des méthodes bactériologiques c'est à dire 1 à 10 *Listeria* par millilitre de lait.

Cependant, il faut signaler que ces techniques peuvent induire des faux négatifs liés aux bactéries stressées.

De plus, certains auteurs préconisent la confirmation des échantillons présumés positifs par des méthodes bactériologiques.

### IX.4.3.Méthodes immunophysiques.

Ces méthodes sont basées sur la formation d'un complexe antigène / anticorps révélé à l'aide d'une technique physique (3, 30 ).

Parmi ces techniques, on peut citer :

- Test immuno-latex,
- La cytométrie de flux,
- L'immunocapture.

Les principaux caractères de ces techniques figurent dans le tableau IX ci après :

Tableau IX : Tableau récapitulatif des principaux caractères des techniques immuno-physiques (30).

Méthodes	Cytométrie De flux	Immuno-latex	Immunocapture	
			Quantitative (Lister Test)	Qualitative (Lister Sreen )
Détection	Quantitative	Quantitative (Listeria Rapid Test)	Quantitative (Lister Test)	Qualitative (Lister Sreen )
Spécificité	Listeria spp	Listeria spp	Listeria spp	Listeria spp
Sensibilité	$10^6$ à $10^7$	$10^4$ à $10^5$	1	1
Enrichissement	24 h	42 h	Aucun	18 h
Rapidité	26 h	43 h	27 h	42 à 66 h
Système de détection	Fluorescence	Immobilisation complexe Ag/Ac-latex bleu	Etalement sur gélose dot blot	Etalement sue gélose Palcam
Validation AFNOR	Non	1995	Non	1995

#### IX.4.4.Méthodes Physiques.

Une méthode physique a été utilisée pour la détection des *Listeria* : il s'agit de l'impédancemétrie (30).

Cette technique permet de mesurer les variations électriques d'un milieu de culture causées par le métabolisme microbien. Deux électrodes plongées dans le bouillon de culture vont mesurer l'accroissement de la conductance ou de la capacitance lors de la croissance bactérienne.

L'impédancemétrie peut être utilisée pour le dénombrement de micro-organismes puisque le temps de détection dépend de la contamination initiale en micro-organismes.

L'impédancemétrie offre plusieurs avantages tels que :

- la rapidité de la détection, 24 heures environ,
- l'automatisation,
- la standardisation,
- l'économie de milieux de culture.

Cependant, le développement d'un tel système de détection pour les *Listeria*, souvent présentes en faible quantité dans un milieu polycontaminé, se heurte à certaines difficultés.

Le milieu de culture utilisé doit être très sélectif et doit avoir une formulation permettant de fortes variations de conductivité lors du métabolisme des *Listeria*.

Les difficultés concernant la spécificité du milieu de culture expliquent que l'impédancemétrie est peu utilisée en routine pour détecter les *Listeria*.

#### IX.4.5.Méthodes de biologie moléculaire.

Les méthodes de biologie moléculaire permettent de détecter spécifiquement *Listeria monocytogenes* ou *Listeria spp* à l'aide d'une sonde nucléique dont la cible se trouve sur l'ADN ou l'ARN (3, 28, 30 ).

Ces techniques génétiques présentent comme principal avantage leur spécificité, ce qui permet en particulier la détection de souches atypiques.

Après utilisation de sondes naturelles constituées par exemple d'un fragment du gène de la lystériolysine, un certain nombre d'oligonucléotides ont été synthétisés de façon à détecter les *Listeria* :

- soit par hybridation avec une sonde nucléique,
- soit par la technique PCR avec des amorces.

Les tests d'hybridation d'acides nucléiques sont basés sur la capacité des brins complémentaires d'ARN ou d'ADN à s'associer spécifiquement de façon à former des complexes stables à double brin. Deux sondes spécifiques de l'ARN ribosomal 16 S sont actuellement commercialisés, mais quelque soit la sonde utilisée, cette méthode nécessite un enrichissement de façon à atteindre le seuil de détection même en cas de faible taux de contamination.

La technique d'amplification de gène ou PCR, met en évidence un gène (ou une portion de gène ) spécifique d'un genre, d'une espèce ou d'une souche d'un organisme. Des oligo-nucléotides amorces judicieusement choisies vont permettre l'amplification du fragment délimité par les amorces à l'aide d'une polymérase thermorésistante. Après de multiples cycles, le fragment amplifié est mis en évidence.

La technique PCR présente de multiples avantages, parmi lesquels :

- spécificité,
- sensibilité,
- rapidité,
- possibilité d'automatisation.

Cependant, cette technique n'est pas directement utilisable sur les échantillons de laits et même autres que le lait, car certains constituants inhibent la réaction d'amplification génique. Il faut en outre distinguer les bactéries mortes des bactéries vivantes, et détecter les *Listeria* lorsqu'elles sont en petit nombre, or la prise d'essai utilisée pour la PCR est très faible.

En conclusion, une grande variété de méthodes ont été développées pour la détection des *Listeria* à partir du lait ainsi que d'autres denrées alimentaires.

Le choix d'une méthode dépend des exigences des utilisateurs, qui seront en face de différents critères d'appréciation tels que la rapidité, la sensibilité, la spécificité, le coût, les possibilités ou les exigences de dénombrement et l'automatisation surtout en industrie laitière.

Par ailleurs, malgré l'évolution des méthodes de détection, aucun test utilisable en routine ne détecte spécifiquement les souches réellement pathogènes. La mise au point de techniques de détection des facteurs de virulence de *Listeria monocytogenes* est un des objectifs à atteindre. Dans ce sens, la PCR sera sans doute, l'une des méthodes qui pourra assurer cette spécificité.

Enfin, le tableau X ci-après, apporte une récapitulation de toutes ces techniques et peut orienter tel ou tel laboratoire vers l'utilisation de telle ou telle technique en fonction de ses moyens et de ses objectifs.

Tableau X : Critères de choix d'une technique (30).

	Sensibilité	Spécificité	Coût	Dénombrement	Automatisation	Rapidité
Méthodes Bactériologiques	+	Listeria	+	Oui	Oui	+
Méthodes ELISA	+	Listeria	++	Non	Oui	Etape de révélation rapide
Immunocapture	++	Listeria	+++	Oui	Oui	Enrichissement rapide
Hybridation avec Sonde	+	Listeria et L.monocytogenes	+++	Non	Semi-Automatisé	Etape de révélation rapide
PCR	++	Listeria et L.monocytogenes	+++	Non	Semi-Automatisé	Etape de révélation rapide
Immunolatex	+	Listeria	++	Non	Semi-Automatisé	Etape de révélation rapide
Impédancemétrie	+	Listeria	++	Oui	Oui	Etape de révélation rapide
Système VIDAS	+	Listeria et L.monocytogenes	+++	Non	Oui	Etape de révélation rapide



### IX.5.Lysotypie.

Dans le genre *Listeria* on distingue :

- 15 antigènes somatiques (I à XV ),
- 5 antigènes flagellaires (A à E )

La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars (26, 58, 62, 65 ).

En France, l'utilisation de la sérotypie est d'intérêt limité puisque plus de 95 % des souches isolées des infections cliniques appartiennent au sérovar 1/2a, 1/2b ou 4b. Il n'y a pas de rapport entre un sérovar particulier et son origine géographique et animale (58, 62).

Actuellement, il est bien connu que le sérovar 4b de *Listeria monocytogenes* est le plus impliqué dans les cas de listériose animale et humaine (58, 61, 62).

*Listeria monocytogenes* sérovar 5, nommée depuis 1984 *Listeria ivanovii*, n'est jamais isolée des aliments et elle est peu retrouvée en pathologie humaine, par contre elle est surtout rencontrée chez les ruminants et plus particulièrement chez le mouton (Broadent, 1972 ).

Les différents caractères antigéniques des sérovars de *Listeria* sont consignés dans le tableau IV ci-après (26, 62 ).

Tableau XI : Caractères antigéniques des sérovars de *Listeria* (62).

Espèces	Sérovars	Antigènes Somatiques	Antigènes Flagellaires
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a	I II (III)	AB
	1/2b	I II (III)	ABC
	1/2c	I II (III)	B D
	3a	II (III) IV	AB
	3b	II (III) IV (XII XIII)	ABC
	3c	II (III) IV (XII XIII)	B D
	4a	(III) (V) VIII IX	ABC
	4ab	(III) V VI VIII IX X	ABC
	4b	(III) V VI	ABC
	4c	(III) V VII	ABC
	4d	(III) (V) VI VIII	ABC
	4c	(III) V VI (VIII) IX	ABC
	7	(III) XII XIII	ABC
<i>Listeria ivanovii</i>	5	(III) (V) VI (VIII) X	ABC
<i>Listeria innocua</i>	6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	ABC
	6b	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI	ABC
	4ab	(III) V VI VII IX X	ABC
<i>Listeria welshimeri</i>	1/2b	I II (III)	ABC
	4c	(III) V VII	
	6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	
	6b	(III) (VII) IX X XI	
<i>Listeria Seeligeri</i>	1/2a	I II (III)	AB
	1/2b	I II (III)	ABC
	1/2c	I II (III)	B D
	4b	(III) V VI	ABC
	4c	(III) V VII	ABC
	4d	(III) (V) VI VIII	ABC
	6b	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI	ABC
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>grayi</i>		(III) XII XIV	E
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>		(III) XII XIV	E

## Chapitre X : Pouvoir pathogène des Listeria.

Parmi les sept espèces que regroupe le genre *Listeria*, seules *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* sont naturellement et expérimentalement pathogènes.

Cette dernière est responsable essentiellement des avortements chez les bovins, ovins et caprins.

*Listeria monocytogenes* est une bactérie pathogène opportuniste, à multiplication intracellulaire facultative.

Son pouvoir pathogène est très large. Cette bactérie entraîne en effet des infections chez plus de soixante espèces animales, incluant l'homme, 37 espèces de mammifères, 17 espèces d'oiseaux, des poissons, des crustacés et même des insectes (cf. tableau I).

Une des caractéristiques très remarquable de ces infections est la fréquence des infections neuro-méningée aussi bien chez l'homme que chez l'animal.

La listériose est présente dans les pays industrialisés, sans qu'il en soit possible de dire si elle est absente des autres pays ou présente et non diagnostiquée.

### X.1.L'infection par *Listeria monocytogenes*.

#### X.1.1.Pouvoir pathogène expérimental : In vivo.

De nombreuses espèces animales, en particulier les lapins, souris et cobayes, sont sensibles à l'infection expérimentale.

L'animal de laboratoire le plus utilisé est la souris. En effet, la listériose murine est comparable à la listériose humaine en de nombreux points : toutes les souches de *Listeria monocytogenes* isolées à partir de cas cliniques se sont révélées virulentes chez la souris ; des complications similaires à celles rencontrées chez la femme enceinte infectée sont retrouvées dans le cas d'une infection chez la souris gravide et les observations immuno-pathologiques sont similaires. (25, 26, 38, 94, 99 ).

#### X.1.2.Physiopathologie de la listériose.

Les données anatomo-pathologiques et celles provenant des modèles expérimentaux chez l'animal, ainsi que l'origine alimentaire de la contamination, indiquent que la porte d'entrée de *Listeria* dans son hôte est très probablement localisée au niveau du tube digestif.

En 1972 , dans une étude pionnière en microscopie électronique, P.Racz a montré que *Listeria monocytogenes* est capable de pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin (après inoculation per-os d'une dose sub-léthale de *Listeria monocytogenes* ) chez les cobayes.

Quelques années, plus tard, deux études réalisées chez la souris (94) montraient que *Listeria monocytogenes* est surtout retrouvée dans les plaques de Peyer et non dans les cellules intestinales absorbantes, comme cela a été observé par Racz. La contradiction apparente de ces travaux reflète :

- d'une part, des conditions expérimentales très différentes,
- d'autre part, l'existence de plusieurs sites d'entrée dans l'organisme,
- d'autre part, encore, la difficulté de produire une infection expérimentale par cette voie.

En effet, après la traversée de la barrière intestinale, les bactéries sont phagocytées par les macrophages résidents de la lamina propria et circulent, libres ou dans des macrophages via la lymphe, vers les ganglions mésentériques. Elles sont ensuite véhiculées dans les canaux lymphatiques efférents qui se déversent dans la circulation sanguine. Les bactéries se retrouvent alors dans le foie et la rate, principaux organes filtres du système sanguin. Elles sont alors très rapidement ingérées et détruites par les cellules phagocytaires du système réticulo-endothélial et en particulier par les macrophages résidents du foie, les cellules de Küpffer (94). Les bactéries survivantes peuvent se multiplier dans les macrophages et/ou envahir les hépatocytes adjacents qui représentent un site privilégié de multiplication intracellulaire bactérienne.

Au début de l'infection, les hépatocytes infectés sont lysés par les neutrophiles. Les bactéries se retrouvent alors à l'extérieur des cellules et deviennent accessibles à l'ingestion par les macrophages listéricides. Si la multiplication bactérienne dans ces foyers infectieux n'est pas rapidement contrôlée par le système immunitaire de l'hôte, les bactéries sont à nouveau disséminées dans le courant sanguin et se dirigent vers le système nerveux et l'unité foeto-placentaire.

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

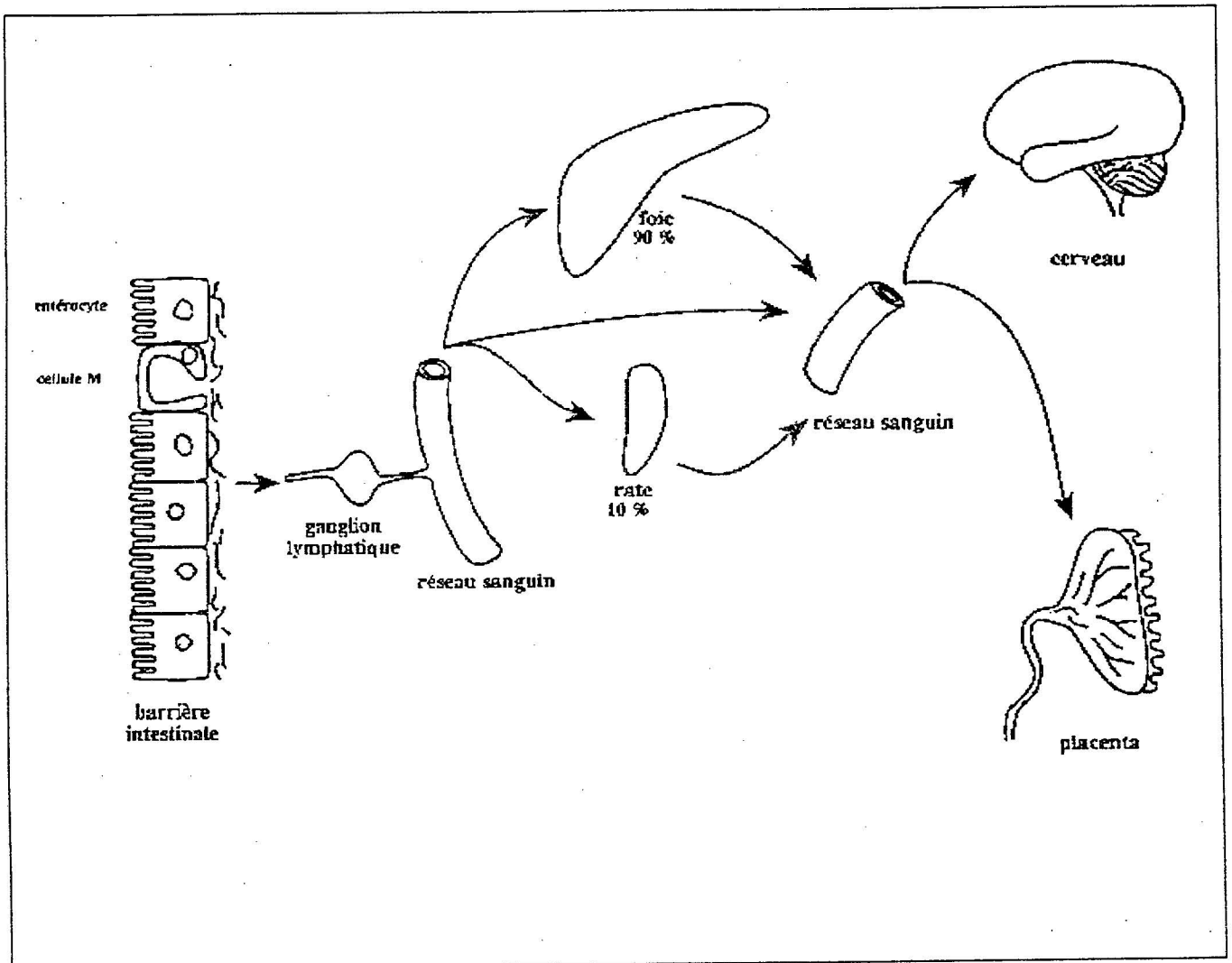


Schéma n°6 : Représentation schématique des différentes étapes de l'infection par *Listeria monocytogenes* au niveau de l'organisme hôte (26, 38, 94).

Ce schéma physiologique souligne l'importance d'un mécanisme clé dans la virulence de *Listeria monocytogenes*, sa capacité à pénétrer et à se multiplier dans de nombreuses cellules animales et à échapper ainsi à certains mécanismes de défense de l'organisme.

Il faut souligner également la capacité de *Listeria* à passer directement d'une cellule à l'autre et de se disséminer ainsi à l'intérieur des tissus ; ceci est alors une autre stratégie très importante.

### X.1.3. Description du cycle infectieux au niveau cellulaire : In vitro.

Le développement des modèles in vitro d'infection cellulaire par *Listeria monocytogenes*, au cours de ces dernières années, a permis de décrire les principales étapes de l'invasion des cellules eucaryotes.

Les cellules utilisées sont d'origine diverse, soit des cellules phagocytaires professionnelles de type macrophagique (macrophages primaires d'origine péritonéale ou médullaire ), ou cellules de la lignée.

Les cellules sont cultivées en monocouche sur des supports variés et infectées par les bactéries à des multiplicités d'infection comprises entre 1 et 100 bactéries par cellule. L'entrée des *Listeria* et leur croissance intracellulaire peuvent être étudiées quantitativement par le dénombrement de bactéries restées viables en présence de gentamicine, un antibiotique qui utilisé à une concentration approprié, ne pénètre pas à l'intérieur des cellules vivantes et détruit sélectivement les bactéries extracellulaires (25, 26, 94).

L'ensemble du processus infectieux a été visualisé grâce à la microscopie électronique (94).

L'utilisation de la microscopie à fluorescence et le marquage spécifique de certaines molécules comme l'actine ont permis de visualiser l'interaction des *Listeria* avec les constituants du cytosquelette cellulaire.

En dehors de la phase d'entrée, les mêmes mécanismes semblent être mis en jeu dans les cellules phagocytaires professionnelles et non professionnelles. *Listeria monocytogenes* est phagocytée par les cellules phagocytaires, ou induit sa propre phagocytose dans les cellules non phagocytaires.

Le mécanisme d'entrée dans les cellules épithéliales est apparenté à la phagocytose, car il fait intervenir le système des microfilaments d'actine de la cellule hôte. En effet, les cellules prétraitées avec des drogues qui inhibent la polymérisation de l'actine telles que les cytochalasines, sont incompetentes pour l'infection par *Listeria monocytogenes*.

Peu après son internalisation, la bactérie est présente dans un phagolysosome qu'elle lyse très rapidement (en moins de trente minutes ). Elle gagne ensuite le cytoplasme où non seulement, elle se multiplie, mais où elle induit un phénomène décrit également pour *Shigella flexneri*, la polymérisation de l'actine cellulaire. Cette actine filamenteuse recouvre tout d'abord la bactérie puis se réorganise pour former une comète qui se situe du côté opposé à la direction prise par la bactérie.

Environ 3 heures après l'infection, quand *Listeria monocytogenes* atteint la membrane de la cellule hôte, elle la déforme, créant une protrusion cellulaire qui peut atteindre des dizaines de fois la longueur de la bactérie.

Si cette protrusion entre en contact avec une autre cellule, elle est alors endocytée et la bactérie se retrouve dans une vacuole à deux membranes qu'elle peut lyser et ainsi recommencer un nouveau cycle de multiplication.

Les différentes étapes de ce cycle sont schématisées sur le schéma n°7 ci dessous.

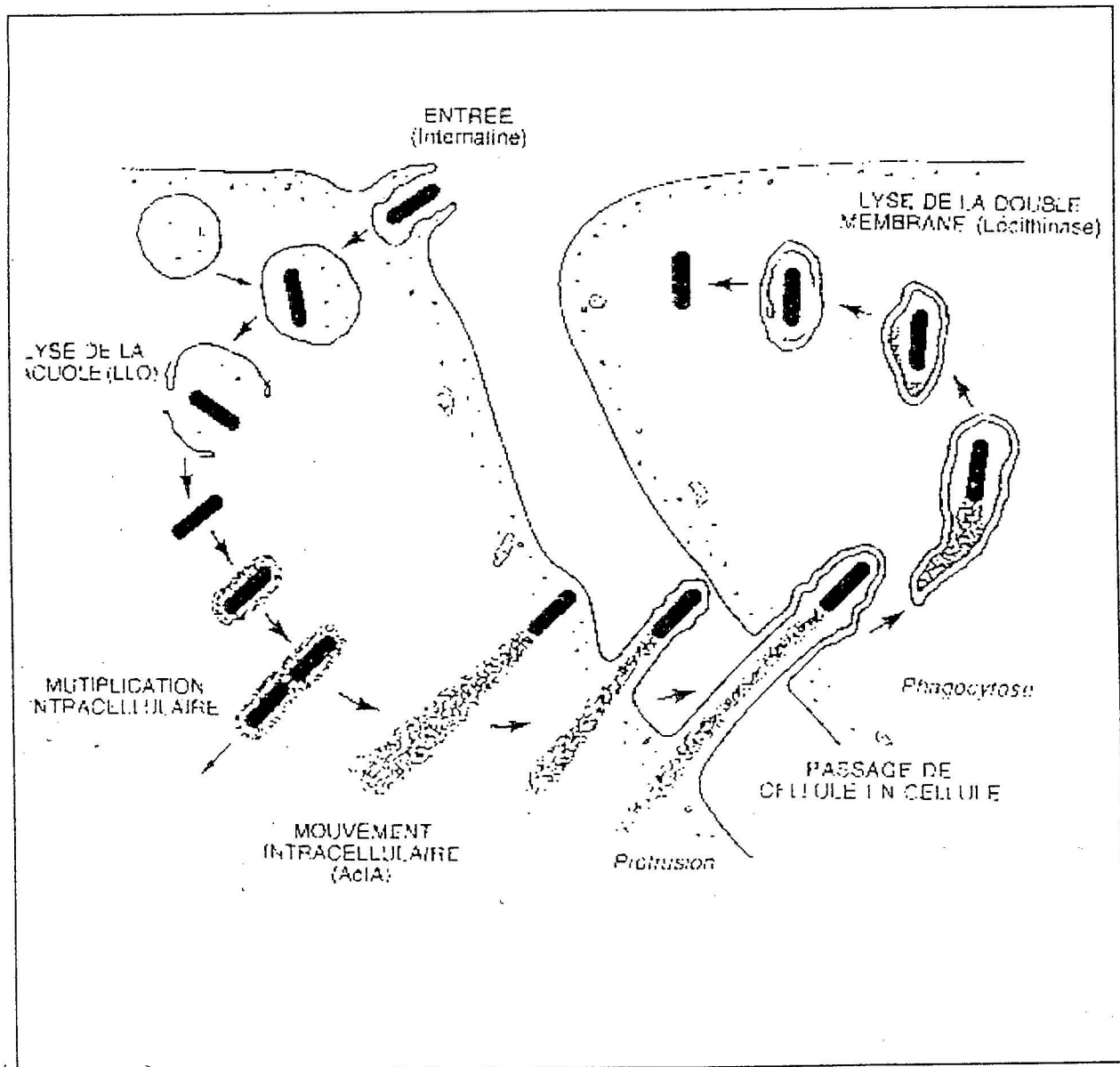


Schéma n°7 : Mouvement intracellulaire de *Listeria monocytogenes* et le passage de cellule à cellule (94).

Le passage direct de cellule à cellule permet à *Listeria monocytogenes* d'échapper à certaines défenses immunitaires de l'hôte telles que les anticorps circulants ou le système du complément.

## X.2. Les déterminants génétiques et moléculaires du pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes*.

Les principaux facteurs de virulence seront décrits en suivant la chronologie des différentes étapes du cycle infectieux au niveau cellulaire.

### X.2.1. Entrée dans les cellules.

L'adhésion est la première étape de l'invasion des cellules hôtes par les bactéries. Cette étape pourrait faire intervenir des interactions de type lectine-substrat.

D'une part, le sucre alpha D-galactose présent à la surface d'une souche virulente de *Listeria monocytogenes*, est responsable de la fixation de certaines lectines et également récepteur du galactose présent sur certaines cellules eucaryotes non phagocytaires. Deux souches non virulentes n'auraient pas ces résidus alpha D-galactose présent à leur surface (Coward et al 1990).

D'autre part, des composés de type lectines, capables de fixer certains sucres, ont été identifiés à la surface de *Listeria monocytogenes*.

Ces composés seraient de nature protéique, mais leur rôle dans l'adhésion n'a pas été élucidé (Cottin et al 1990).

Il a également été rapporté que *Listeria monocytogenes* est capable de se lier à une molécule de la matrice extracellulaire, la virionectine. Cependant, son rôle dans la virulence semble peu probable puisque des souches non pathogènes de *Listeria* fixent aussi cette molécule (94).

En revanche, la fibronectine dont le rôle dans l'adhésion a été établi pour d'autres bactéries à Gram positif telles que les *Streptocoques* et les *Staphylocoques*, ne se fixe pas sur *Listeria*.

A l'heure actuelle, il est encore difficile de faire une distinction très précise, chez *Listeria monocytogenes* entre les :

- facteurs d'adhésion,
- facteurs d'invasion.



Le mécanisme d'entrée de *Listeria monocytogenes* dans les cellules phagocytaires professionnelles est un processus de phagocytose stricto sensu impliquant plusieurs récepteurs cellulaires.

Une corrélation intéressante a été établie entre la nature moléculaire du récepteur utilisé et le pouvoir bactéricide des macrophages.

En effet, dans les macrophages listéricides, le récepteur de type 3 du complément (CR 3) est le récepteur majeur, qui reconnaît spécifiquement les molécules C3b du complément déposées à la surface des bactéries.

Dans les macrophages non listéricides, des récepteurs différents du CR3 sont utilisés. Leur nature moléculaire n'est pas encore établie (94).

L'entrée de *Listeria monocytogenes* dans les cellules non phagocytaires telles que les cellules épithéliales et fibroblastiques fait intervenir un processus apparenté à la phagocytose. Cette propriété à induire sa propre phagocytose au niveau des cellules hôtes est spécifique des espèces pathogènes du genre *Listeria*.

A ce jour, deux facteurs bactériens ont été impliqués dans l'invasion des cellules non phagocytaires :

- la protéine p60,
- l'internaline.

#### *La protéine p 60.*

Elle a d'abord été décrite comme étant une protéine majeure de 60 KDa, sécrétée par *Listeria monocytogenes* et nécessaire pour l'invasion in vitro des cellules fibroblastiques de la lignée 3T6.

En réalité, le rôle de cette protéine dans l'invasion reste difficile à interpréter. Il faut d'ailleurs noter que la plupart des espèces du genre *Listeria*, pathogènes ou non, produisent des protéines immunologiquement apparentées à la p60 et possèdent, au sein de leur chromosome, des séquences homologues au gène iap ( invasion associated protein ). (25, 38, 94 ).

#### *L'internaline.*

Cette protéine a d'abord été identifiée en étudiant des mutants non invasifs pour les cellules épithéliales d'origine intestinale.

La nature du récepteur cellulaire reconnu par l'internaline n'est pas encore établie (25, 38, 94 ).

### X.2.2. Le mouvement intracellulaire de *Listeria monocytogenes* et le passage de cellule à cellule. (cf. schéma n°7 ci-avant).

La capacité de *Listeria monocytogenes* à se mouvoir à l'intérieur des cellules en piratant le cytosquelette de l'hôte et ainsi à passer directement de cellule à cellule est un déterminant essentiel de la virulence.

La motilité intracellulaire de *Listeria monocytogenes* qui est strictement corrélée à la polymérisation de l'actine cellulaire en fait un modèle simple de mouvement lié à l'assemblage de l'actine, et pour cette raison très convoitée par les biologistes cellulaires qui s'intéressent à la nucléation de l'actine (94). Cette motilité intracellulaire est très différente de la motilité propre de *Listeria monocytogenes* dans le milieu extracellulaire. En effet, cultivée entre 20 et 25°C, *Listeria monocytogenes* est mobile grâce à la production d'un à quatre flagelles péritriches, à 37°C les flagelles sont absents (66, 94).

Le passage direct de cellule à cellule peut être visualisé in vitro en utilisant le test de formation de plages décrit pour la première fois par Havell en 1986. Ce test consiste à infecter une monocouche de cellules fibroblastiques par *Listeria monocytogenes* à une faible multiplicité d'infection et à recouvrir cette monocouche d'une surcouche d'agarose contenant de la gentamicine qui empêche la reinfection des cellules par les bactéries extracellulaires.

L'apparition de plages de lyse permet alors, de visualiser le passage des bactéries dans les cellules voisines des cellules infectées.

Ainsi, des mutants incapables de former des plages de lyse ont pu être isolés et l'analyse de ces mutants montre que leur virulence est fortement atténuée chez la souris, bien qu'ils soient capables d'envahir les cellules et de se multiplier dans le cytoplasme.

## Chapitre XI : Traitement de la listériose.

### XI.1. En médecine vétérinaire.

En médecine vétérinaire, la mise en place et le choix du traitement dépendent à la fois du stade et de la forme de la maladie, mais aussi de l'âge des animaux tout en tenant compte du fait que certains malades restent porteurs sains pendant de longues périodes, donc entretiennent bien le foyer infectieux : (32, 46, 101, 105, 106).

Tout d'abord en ce qui concerne les animaux atteints d'encéphalites ou de méningo-encéphalites à *Listeria*, ainsi que les veaux nés après avortement, ils finiront par mourir comme on l'a déjà vu dans la partie clinique, il n'y a donc pas lieu d'instaurer un traitement (32, 105).

En ce qui concerne les animaux jeunes atteints d'une forme clinique aiguë, l'injection intraveineuse de chlortétracycline à raison de 12 mg par kg de poids vif et par jour pendant 5 jours est assez efficace contre la méningo-encéphalite bovine, mais moins chez le mouton (32).

Le taux de guérison dépend étroitement de la précocité du traitement. Si des signes graves sont déjà visibles, la mort s'ensuit malgré la mise en place d'un traitement.

Habituellement dans une enzootie, le premier sujet meurt, les cas subséquents sont alors dépistés assez tôt pour que le traitement empêche la mortalité.

Le chloramphénicol et une synergie de pénicilline et de streptomycine à raison de 0,25 g et 300 000 UI, ont été employés avec succès dans la forme septicémique (32, 46).

En ce qui concerne, les vaches ayant avortées, et dans le but de minimiser au maximum les foyers infectieux, il est vivement conseiller aujourd'hui de les abattre, car elles restent excrétrices de *Listeria* pendant très longtemps, jusqu'à 6 mois et plus.

### XI.2. En médecine humaine.

L'Ampicilline est préconisée depuis longtemps et reste l'antibiotique de choix dans le traitement des listérioses (46, 86, 87).

L'association de cette molécule avec un aminoside comme la gentamicine à raison de 3 mg/kg/jour, permet d'obtenir un effet bactéricide plus rapide.

Un relais oral (ampicilline 4 g/jour ) peut être institué après 15 jours de traitement intraveineux. La durée du traitement est habituellement de 4 à 6 semaines, un minimum de 2 semaines étant requis dans tous les cas.

En raison de leur faible diffusion méningée, une injection intra-thécale d'aminosides est quelque fois préconisée bien que l'efficacité réelle de cette administration soit contestée par certains auteurs.

Du fait de leur caractère toxique sur le rein et l'oreille interne, un dosage sanguin des aminosides devra être effectué régulièrement pendant la durée du traitement.

En cas d'allergie aux  $\beta$ -lactamines, l'alternative est représentée par l'association triméthoprimé – sulfaméthoxazole. Cette association aurait une efficacité équivalente à l'association classique ampicilline – gentamicine et de plus, elle présente une bonne pénétration de la barrière hémoméningée et une activité intéressante sur les bactéries intracellulaires (46, 68).

La vancomycine peut également être considérée pour les bactériémies primaires.

Par contre, il est important de rappeler que les céphalosporines de troisième génération, utilisées très fréquemment dans le traitement d'attaque des méningites et les quinolones récentes, ayant l'avantage d'une bonne pénétration cellulaire, sont le plus souvent inefficaces dans le traitement des listérioses(46).

Le succès du traitement dépend donc, tout particulièrement de sa précocité, notamment dans les infections du système nerveux central.

## Chapitre XII : Sensibilité des *Listeria* aux antibiotiques.

La sensibilité de *Listeria monocytogenes* aux agents antimicrobiens est assez stable depuis plusieurs années.

In vitro, *Listeria monocytogenes* et les autres *Listeria* sont généralement sensibles à de nombreux antibiotiques parmi lesquels :

- pénicilline G,
- ampicilline,
- amoxicilline,
- azlocilline,
- imipénème,
- gentamicine,
- sisomicine,
- nétilmicine,
- amikacine,
- kanamycine,
- streptomycine,
- érythromycine,
- clarithromycine,
- roxithromycine,
- tyrothricine,
- vancomycine,
- teicoplanine,
- daptomycine,
- triméthoprimé-sulfaméthoxazole,
- rifampicine,
- tétracyclines.

Une résistance naturelle est notée vis-à-vis des :

- céphalosporines (notamment vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération à large spectre comme la céfotaxime ou la céfépime),
- l'aztréonam,
- l'acide nalidixique,
- l'ofloxacine,
- fluoroquinolones récentes,
- fosfomycine .

La sensibilité est intermédiaire pour la :

- céfalotine,
- ciprofloxacine,
- chloramphénicol,
- clindamycine .

Quelques rares souches sont capables d'acquérir une résistance à la streptomycine, à la kanamycine, à la gentamicine, au triméthoprim, aux tétracyclines ou à la rifampicine.

L'émergence des souches résistantes résulte généralement de l'acquisition de plasmides.

Ainsi, en 1988, une souche multirésistante a été isolée en France. Cette souche résistait à l'érythromycine, à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et à la minocycline. L'ensemble de ces caractères est porté par un plasmide de 37 kb (le plasmide p IP 811) également présent chez des souches de *Enterococcus* sp et de *Streptococcus* sp.

In vitro, les plasmides de résistance aux antibiotiques des entérocoques se transfèrent facilement à des souches de *Listeria* sp. Il est donc probable que ce transfert soit possible in vivo notamment lorsque des souches de *Listeria* sont hébergées dans le tube digestif.

Par ailleurs, l'utilisation anarchique des antibiotiques aussi bien en médecine humaine que vétérinaire, pourrait dans un proche avenir faire émerger de nombreuses souches de *Listeria* multirésistantes.

La résistance à la tétracycline est la résistance acquise la plus fréquemment observée chez *Listeria monocytogenes* aussi bien chez des souches isolées de prélèvements cliniques que chez des souches isolées des aliments et de l'environnement (46).

En revanche, aucune souche résistante aux pénicillines n'a été isolée.

#### Conservation des souches.

Les souches de *Listeria* peuvent être conservées dans un tube de gélose profonde à 15°C, elles pourront survivre tant que la gélose ne sera pas desséchée (62).

## Chapitre XIII : Prophylaxie et recommandations.

Actuellement, on évolue progressivement vers la mise en place de systèmes HACCP en entreprises. Ces systèmes d'assurance qualité sont fondés sur la maîtrise des points critiques, à savoir la maîtrise de tout danger qui risque de porter atteinte à la fois à la santé humaine, à la santé animale ou à l'industrie agro-alimentaire de façon générale. De plus, ces systèmes s'étalent de la fourche (élevage) à la fourchette (consommateur), autrement dit, ils permettent non seulement de chercher, de découvrir et de mesurer la valeur des points critiques, mais aussi d'y apporter des mesures correctives. C'est donc, dans ce sens et sur la base de ce nouveau concept, que sera mise en place, la prophylaxie de la listériose au niveau des élevages, en industrie, mais aussi chez l'homme.

Par ailleurs, et compte tenu du fait que, *Listeria monocytogenes*, est une bactérie ubiquiste et résistante, il serait donc, illusoire de penser à son éradication totale. Néanmoins, il ne faut pas non plus, négliger une quelconque étape dans la mise en place de ces systèmes. D'ailleurs, la moindre erreur, permettra d'entretenir une souche et par conséquent, de maintenir et d'enrichir un foyer infectieux d'une part, et d'affaiblir toutes les démarches entreprises d'autre part (46, 56, 76, 78, 79).

### XIII.1. Prophylaxie dans les élevages.

Dans les élevages, plusieurs points forts sont à maîtriser :

- D'abord l'animal lui-même : dans ce cas, la prophylaxie passe nécessairement par le dépistage systématique en vue de détecter les vaches excrétrices. Cette recherche doit s'effectuer avec un rythme annuel ou semestriel et devra être réalisée à l'échelon individuel ou collectif. La réforme des femelles excrétrices est une nécessité(46).
- L'alimentation : compte tenu du fait que les ensilages constituent les principaux foyers d'entretien et de multiplication des *Listeria*, ils doivent être correctement préparés et conservés. Un soin particulier doit être apporté au tassement et à l'absence de mottes de terre. Certains auteurs préconisent l'ensemencement des ensilages avec des souches de *Lactococcus lactis* ou de *Lactobacillus plantarum* qui inhibent la croissance des *Listeria*. L'utilisation de ce procédé apparaît prometteur (46).
- L'hygiène des locaux et en particulier l'hygiène de la salle et du matériel de traite. Les désinfectants classiques (détergent acide anionique, ammonium quaternaire, iode, hypochlorite ) sont actifs sur *Listeria monocytogenes* (46, 79).

### XIII.2. Prophylaxie dans les industries.

Dans les industries, plusieurs points forts sont également à maîtriser :

- Les *Listeria* sont introduites dans les locaux de transformation par les matières premières contaminées, par les équipements de manutention contaminés, par les chaussures et les vêtements du personnel, par les individus porteurs sains. Leur croissance et leur survie est favorisée par l'humidité et par la présence de nutriments. En effet, *Listeria monocytogenes* est capable d'adhérer à de nombreuses surfaces (y compris le verre ou l'acier inoxydable), elle survit dans l'environnement des entreprises de transformation, elle peut être retrouvée sur les mains du personnel même après lavage et elle survit dans les aérosols. L'utilisation de conditionnement sous vide ou sous atmosphère modifiée n'a aucun effet significatif sur la croissance de *Listeria monocytogenes* (46, 75, 79). Par conséquent, la prophylaxie de la listériose sera fondée sur :

- la sélection rigoureuse des matières premières,
- le strict respect des plans de nettoyage et de désinfection,
- le strict respect des bonnes pratiques de fabrication (BPF).

A titre d'exemple, en France, 2 à 4% des prélèvements de laits crus sont reconnus contaminés, par *Listeria*. Cette contamination présente un risque majeur pour les produits fabriqués à base de lait cru ; c'est le cas de certains fromages, d'ailleurs, environ 10% d'entre eux, sont contaminés (46).

- L'hygiène de l'abattage est également cruciale car les carcasses des animaux de boucherie sont essentiellement contaminées en surface et, à l'abattoir, le poste de dépouillage est un point critique de contamination. Ultérieurement, les phases de découpe et de conditionnement accroissent les risques. Il est donc nécessaire de veiller au strict respect des normes d'hygiène pour chacun de ces postes à risque (79).
- Respect de la chaîne du froid et réduction des dates limites de consommation. *Listeria monocytogenes* peut se multiplier à basse température mais le temps de génération est beaucoup plus long qu'à température ambiante. Le respect de la chaîne du froid est donc primordial pour éviter une multiplication excessive. Si les industriels et les commerçants ont les capacités techniques d'assurer une bonne conservation des aliments, il n'en est pas toujours de même pour les consommateurs. Un produit présentant très peu de bactéries au moment de la vente peut devenir fortement contaminé lorsqu'il est conservé plusieurs jours voire même plusieurs semaines dans un réfrigérateur domestique dont la température est généralement supérieure à +4°C. Dans ces conditions, une diminution des dates limites de conservation peut constituer une bonne alternative (46, 76, 79).



### XIII.3. Prophylaxie chez l'homme.

La prophylaxie de la listériose humaine est avant tout, une prophylaxie sanitaire fondée sur une éducation sanitaire exemplaire et irréprochable.

L'hygiène corporelle et vestimentaire, individuelle et collective, des manipulateurs doit être rigoureuse. La formation et la sensibilisation du personnel sont particulièrement importantes.

L'OMS préconise dans ce sens, en plus de la visite médicale d'embauche, deux contrôles annuels avec dépistage systématique des porteurs sains et insiste beaucoup sur la formation et l'éducation sanitaire (75, 76).

Par ailleurs, la vaccination et/ou antibioprophyllaxie n'est pas utilisée et, selon un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (approuvé le 29 juin 1999), il n'y a pas lieu de recommander une antibioprophyllaxie systématique en cas de consommation d'un aliment contaminé par *Listeria monocytogenes* (46).

En conclusion, la prophylaxie de la listériose humaine est basée essentiellement sur l'information des populations à risque et sur l'éducation sanitaire.

Les meilleurs conseils que l'on puisse donner aux consommateurs, sont ceux dictés par le Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire (N° 4 du 25 janvier 2000) à savoir :

- Eviter la consommation de lait cru et de produits à base de lait cru,
- Cuire soigneusement les aliments crus d'origine animale,
- Laver soigneusement les légumes crus et les herbes aromatiques,
- Dans le cas de repas qui ne sont pas pris en collectivité, les restes alimentaires et les plats cuisinés doivent être réchauffés soigneusement avant consommation immédiate,
- Conserver les aliments crus, séparément des aliments cuits ou prêts à être consommés,
- Se laver les mains, nettoyer les ustensiles de cuisine après la manipulation d'aliments non cuits,
- Nettoyer fréquemment et désinfecter ensuite avec de l'eau de Javel son réfrigérateur,
- S'assurer que la température du réfrigérateur est suffisamment basse : 4°C,
- Respecter les dates limites de consommation,
- Eviter les croûtes des fromages.

Les recommandations du CDC d'Atlanta sont comparables à celles édictées par la Direction Générale de la Santé de France et reposent sur les mêmes règles citées précédemment.

# **PARTIE II**

## **MATERIEL ET METHODES**

## Chapitre I : Objectifs.

En Algérie, :

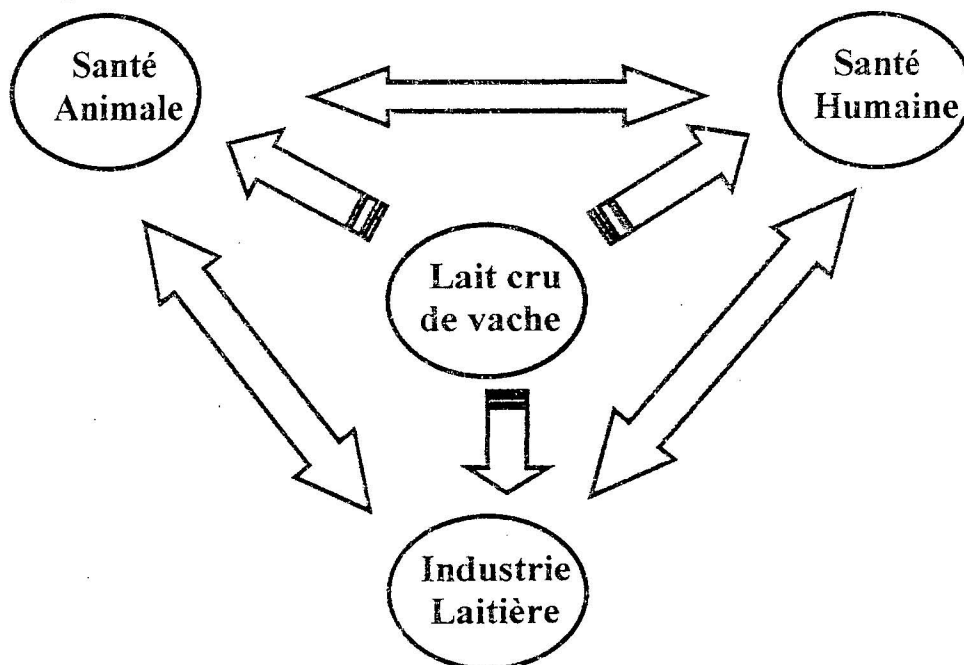
- ❖ En 1967, a été décrit le premier cas de listériose humaine.
- ❖ En 1989, ont été isolées :
  - 11 souches de *Listeria* (dont 2 *monocytogenes*, 1 *welshimeri*, 2 *seeligeri* et 6 *innocua*) à partir de placenta de bovins,
  - 1 souche de *Listeria innocua* à partir de fromages.
- ❖ En 1999, 5 cas de Listériose humaine ont encore été rapportés.
- ❖ En 2000, ont encore été isolées 10 souches de *Listeria* (dont 7 *Listeria monocytogenes* et 3 *Listeria innocua*) à partir de denrées alimentaires (fromages et viandes ).

Devant l'intérêt porté à la production laitière nationale par le PNDA (soutien à l'élevage et à la collecte) :

- L'augmentation d'importation de génisses pleines à partir de pays endémiques (Cf. tableau I, page 5 ), d'une part ;
- Le lait cru de vache, étant le principal vecteur de transmission de la maladie qui touche à la fois, la santé animale, la santé humaine et l'industrie laitière, d'autre part ;

Nous avons donc décidé d'entamer cette enquête en Algérie. Pour cela, nous nous sommes fixés deux objectifs majeurs à savoir,

- La mise en place d'un protocole de recherche, d'isolement et d'identification des *Listeria*.
- Le dépistage de listériose à partir des laits crus de bovins laitiers.



## Chapitre II : Prélèvements.

Les prélèvements de laits crus de vache sont effectués de façon très aseptique. Après un lavage soigneux du pis et des mains des préleveurs, et élimination des premiers jets dans un seau à part, remplir soigneusement environ 450 ml de lait dans des flacons en verre stériles.

Le transport s'effectue en glacière munie de poches de glace dans un temps n'excédant pas les 4 heures.

Selon leur origine, ils sont subdivisés en trois lots :

- **Premier lot** : constitué de 1287 prélèvements de laits crus de vaches en provenance de quatre exploitations laitières situées dans quatre régions différentes :
  - Exploitation laitière de la région de Ain Defla,
  - Exploitation laitière de la région de Birkhadem,
  - Exploitation laitière de la région de Blida,
  - Exploitation laitière de la région de Boudouaou.

Dans le but d'assurer un suivi durant la période de janvier 2000 à août 2001, l'effectif des vaches prélevées 11 fois avec une fréquence bi-mensuelle ainsi que celui des éleveurs par exploitation est rapporté dans le tableau XII ci – après.

Tableau XII : Total des échantillons analysés par exploitation.

<b>Origine des prélèvements</b>	<b>Effectif d'éleveurs par exploitation</b>	<b>Effectif de vaches prélevées</b>	<b>Total des échantillons / exploitation</b>
Exploitation laitière. Ain Defla	12	30	330
Exploitation laitière Birkhadem	9	25	275
Exploitation laitière Blida	8	10	110
Exploitation laitière Boudouaou	40	52	572
Total	69	117	1287

- **Deuxième lot** : constitué de 137 prélèvements de laits crus de vaches d'origine non déterminée en provenance des services vétérinaires officiels, dans le cadre des contrôles continus effectués par l'Institut Pasteur d'Algérie.
- **Troisième lot** : constitué de 8 prélèvements de laits crus de vaches en provenance d'une laiterie privée où *Listeria monocytogenes* a été isolée dans des produits finis (fromages), lors d'une enquête.

Dans le tableau XIII, ci - après, figure le total des prélèvements analysés, par lot.

Tableau XIII : Effectif total des prélèvements analysés par lot.

<b>Lot</b>	<b>1<sup>er</sup></b>	<b>2<sup>ème</sup></b>	<b>3<sup>ème</sup></b>	<b>Total</b>
Nombre de prélèvements	1287	137	8	1432

### **Chapitre III : Choix et intérêt de la méthode retenue.**

En ce qui concerne notre travail, nous avons choisi la méthode AFNOR : NF. V 08-055 pour les raisons suivantes :

- méthode de référence, homologuée et validée par l'AFNOR,
- elle permet une sélection performante des *Listeria* grâce aux suppléments utilisés,
- elle permet également la récupération des *Listeria* dans les produits alimentaires présentant une polycontamination importante,
- elle permet la croissance des *Listeria* "stressées" par des conditions liées au produit (acidité du lait),
- elle est moins coûteuse que les autres techniques, fiable, sensible et rapide,
- tout résultat trouvé positif par une autre méthode doit être confirmé par la méthode AFNOR, pour l'isolement du germe,
- disponibilité des milieux de culture , réactifs et galerie biochimique à l'Institut Pasteur d'Algérie.

## Chapitre IV : Méthode AFNOR.

La recherche des *Listeria* par cette méthode nécessite quatre phases successives avec une prise d'essai soigneusement réalisée sous hotte à flux laminaire elle-même désinfectée aux UV (Ultra Violets ) avant utilisation :

### IV.1.Enrichissement primaire.

L'enrichissement primaire se fait sur bouillon Fraser au demi réparti en flacons à raison de 225 ml auquel on ajoute :

- d'une part 2,25 ml du supplément,
- d'autre part , 25 ml de lait cru à analyser.

Le tout est bien homogénéisé puis incubé à 30°C pendant 24 heures.

### IV.2.Enrichissement secondaire et isolement.

Après une nuit d'incubation, on réalise :

- d'une part, un enrichissement secondaire à partir de l'enrichissement primaire à raison de 0,1 ml sur bouillon Fraser réparti en tubes de 10 ml et additionné de 0,1 ml de supplément,
- d'autre part , un isolement sur gélose Palcam (P1) à partir du milieu d'enrichissement primaire ( Fraser au demi ).

Le tout sera incubé à 37°C cette fois ci, pendant 24 à 48 heures en fonction de la croissance bactérienne.

### IV.3.Isolement, identification et purification.

Après cette période d'incubation :

- l'enrichissement secondaire fera l'objet d'un isolement sur gélose Palcam (P2) et les colonies qui y poussent ultérieurement subiront les mêmes tests que celles ayant poussé sur les boîtes P1.
- les boîtes de Palcam (P1) feront l'objet d'une lecture attentive. Sélectionner s'il y a lieu, au moins cinq colonies caractéristiques (petites de couleur verdâtre avec un halo noir dont le diamètre est inférieur à 1 mm ), donc susceptibles d'appartenir au genre *Listeria*. Ces colonies seront soumises aux tests suivants :
  - réaction catalase à l'aide d'eau oxygénée,
  - coloration de Gram.

Si à ce stade, elles répondent favorablement au genre *Listeria*, c'est à dire, catalase positive et qu'à la coloration de Gram, elles se présentent sous forme de petits bacilles à Gram positif, elles seront purifiées par isolement sur gélose TSAYE qu'on incube à 37°C pendant une nuit.

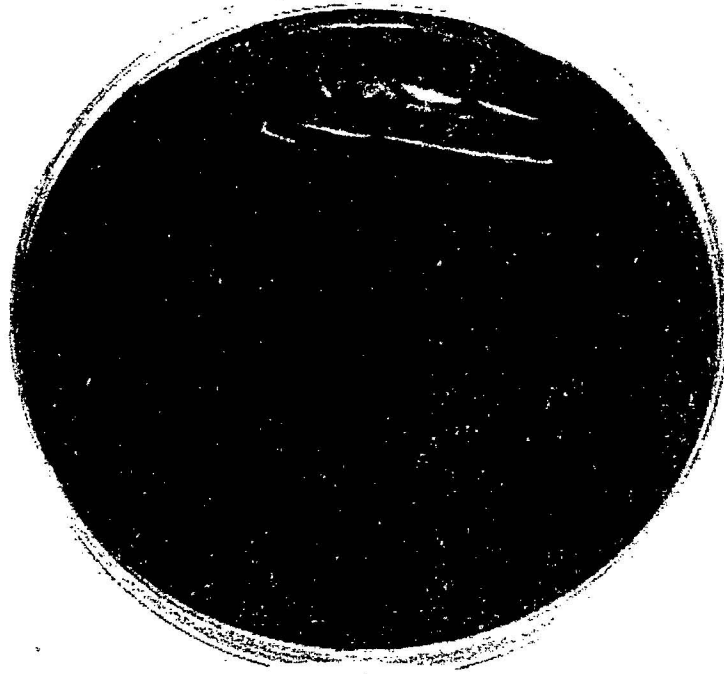


Figure 4 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose Palcam

#### IV.4.Confirmation biochimique.

Après purification sur gélose TSAYE, les colonies suspectes seront soumises aux tests suivants :

- Mobilité : une culture sur gélose mobilité en tubes par piqûre centrale en double :
  - le premier tube sera incubé à 25°C, pendant 24 à 48 heures,
  - le second tube sera incubé à 37°C, pendant 24 à 48 heures.

A 25°C, *Listeria monocytogenes* donne une image typique de sapin renversé, témoignant de son caractère microaérophile, (cf. figure 2).

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



- Hémolyse : un isolement sur gélose au sang de mouton, à l'aide d'une colonie ayant poussé sur gélose TSAYE, qu'on incube à 37°C, pendant une nuit ; cette réaction nous permettra de voir si la souche testée est hémolytique ou non. L'hémolyse se traduit par la formation d'une zone étroite et claire autour des colonies, on parle alors d'hémolyse de type  $\beta$ , comme le montre la figure 3 en page 28.
- Réactions VP et RM : une culture sur milieu Clark et Lubs servira à la détermination des réactions de Voges Prauskaer (VP) et Rouge de Méthyl (RM). Ensemencer un tube contenant le milieu Clark et Lubs à l'aide d'une colonie ayant poussé sur gélose TSAYE, puis l'incuber à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, verser la moitié du tube dans un autre tube stérile :
  - l'un servira à la recherche de la réaction VP, après adjonction des réactifs VP I, puis VP II, attendre environ 3 minutes puis noter la couleur ; si elle vire au rouge orangé, il s'agit d'une réaction positive,
  - l'autre servira à la recherche de la réaction RM, après adjonction du réactif RM ; s'il y a virage de couleur au rouge, il s'agit d'une réaction positive.
- Réduction des Nitrates : une culture dense sur bouillon Nitrate à partir de la gélose TSAYE, qu'on incube à 37°C pendant une nuit. Le lendemain ajouter à peu près 5 gouttes du réactif Nitrate I puis 5 gouttes du réactif Nitrate II :
  - S'il y a apparition d'une coloration rouge ou rose : il y a eu réduction des nitrates,
  - Si le milieu reste incolore : ajouter un peu de poudre de zinc (réducteur de nitrates), agiter un peu puis déposer le tube ouvert sur la paille en position inclinée puis attendre 5 minutes :
    - S'il y a apparition d'une coloration rouge ou rose : cela signifie qu'il restait dans le tube des nitrates qui n'avaient pas été réduits, donc la réaction est négative.
    - Si le milieu reste incolore : cela signifie qu'il ne restait plus de nitrates dans le tube, et que les bactéries les avaient réduits au delà du stade nitrites, donc la réaction est positive.

#### IV.4.1.Camp-test.

Les souches de *Listeria monocytogenes* présentent habituellement sur gélose au sang de mouton ou de cheval une zone d'hémolyse de type  $\beta$  ; dans les cas litigieux, on aura recours au Camp-test, initialement décrit en 1944 pour les streptocoques qui présentent une accentuation de l'hémolyse au voisinage d'un staphylocoque aureus producteur d'une toxine  $\beta$  ( 3,9,23,67).

A cet égard, pour une meilleure distinction entre souche hémolytique et non hémolytique, il a été préconisé de réaliser :

- un Camp-test avec une souche de *Staphylococcus aureus* , réf : ATCC 25923,
- un Camp-test avec une souche de *Rhodococcus equi* , réf : ATCC 6939.

Les Camp-test sont réalisés sur gélose TSA additionnée de 5 % de globules rouges de mouton lavés et remis en suspension dans un volume de tampon PBS égal au volume initial de sang (67).

On réalise d'abord, une première strie à l'aide de souche de *Staphylococcus aureus* sur la gélose TSA, puis une seconde strie parallèle à la première à l'aide de la souche de *Rhodococcus equi* , puis une troisième strie à l'aide d'une souche de *Listeria monocytogenes* réf : ATCC 19118 (témoin) perpendiculairement aux deux premières, puis une quatrième souche à tester, en veillant à ce que les stries ne se touchent pas entre elles et restent donc distantes de 2 millimètres, comme l'indique le schéma n°8 ci-après

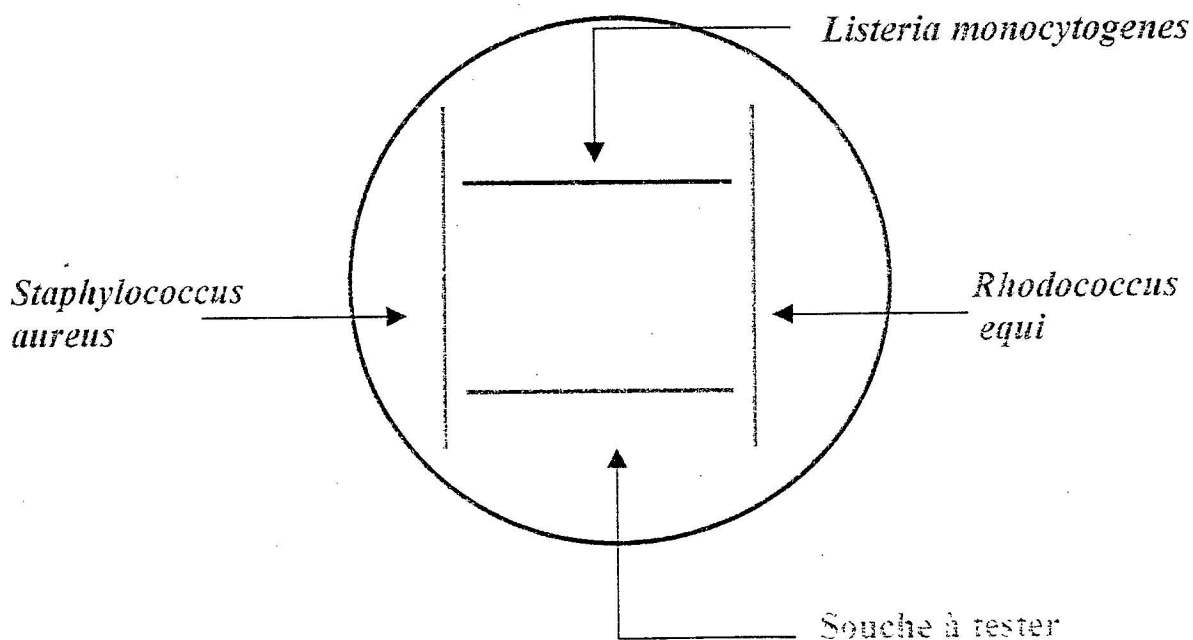
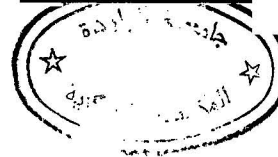


Schéma n° 8 : Camp-test avant incubation



Après une période d'incubation de 36 à 48 heures à 37°C, on observe l'accentuation de l'hémolyse autour de la zone adjacente perpendiculairement à la strie de *Staphylococcus aureus*, sous forme d'une pèle ou d'une brèche, comme l'indique le schéma n°9 ci-après.

L'identification de *Listeria ivanovii* peut également être confirmée par la mise en évidence de l'hémolyse accentuée autour de la zone adjacente perpendiculairement à la strie de *Rhodococcus equi*.

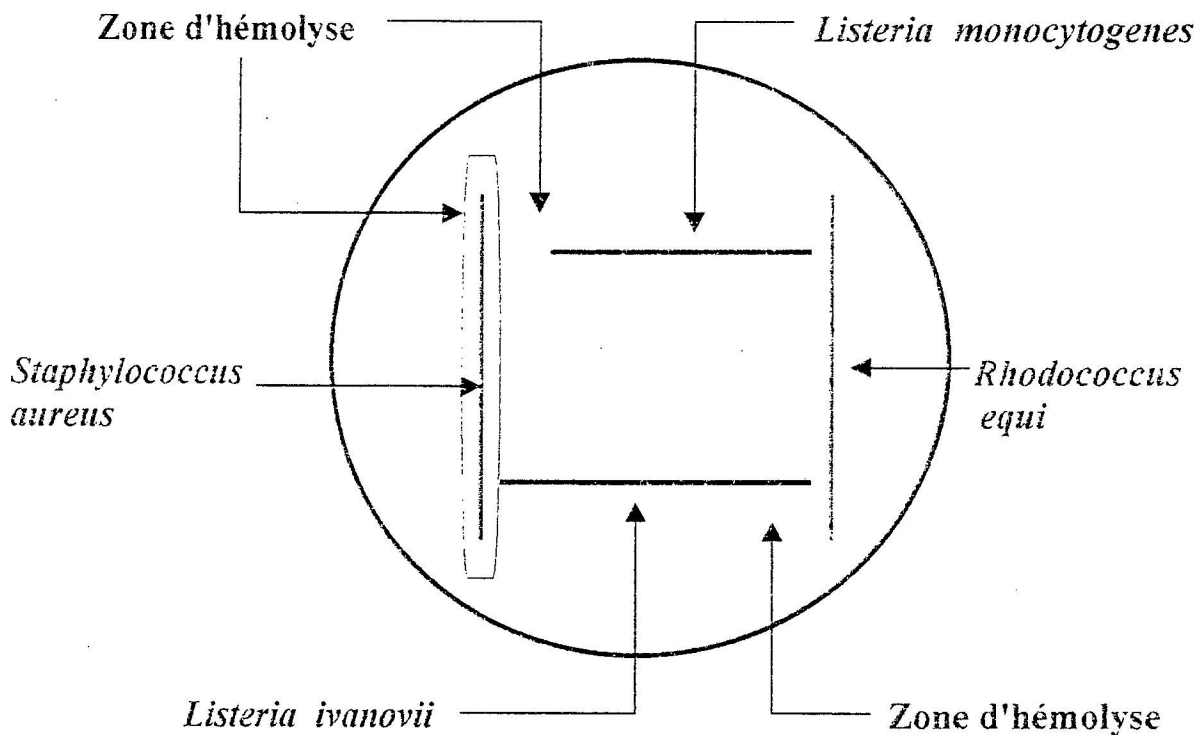


Schéma n° 9 : Camp-test après incubation.

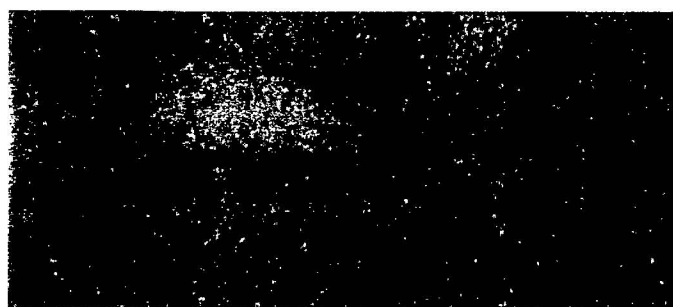


Figure 5 : Aspect du Camp-test sur gélose TSA

#### IV.4.2. Galerie Biochimique : API-Listeria.

API Listeria est un système d'identification des *Listeria* utilisant des tests standardisés et miniaturisés, ainsi qu'une base de données spécifique. Il permet la caractérisation du genre *Listeria* par élimination des espèces n'appartenant pas au genre *Listeria*.

Principe :

La galerie API Listeria comporte 10 microtubes ou cupules contenant des substrats sous forme déshydratée, qui permettent la réalisation des tests enzymatiques et qui sont disposés de la façon dont l'indique la figure 6 ci-après.

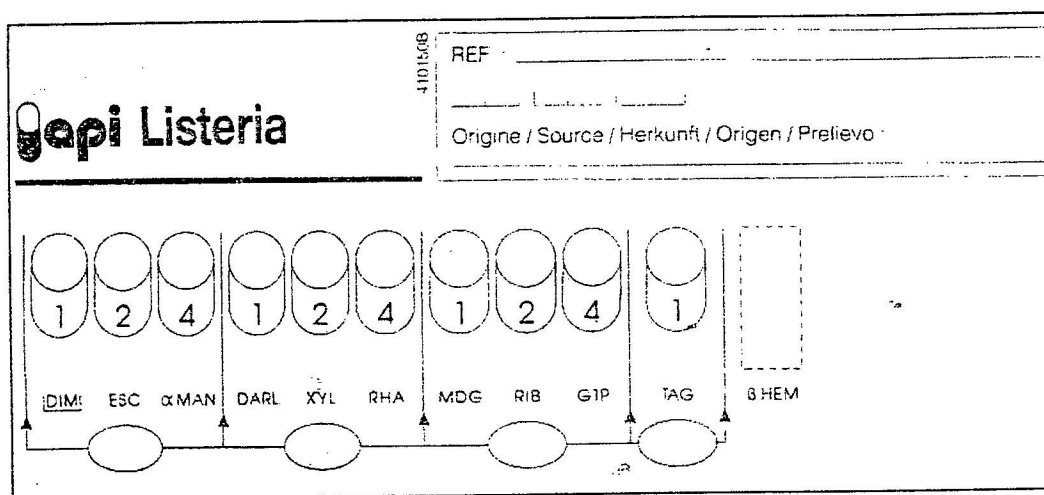


Figure 6 : Présentation de la Galerie API Listeria.

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

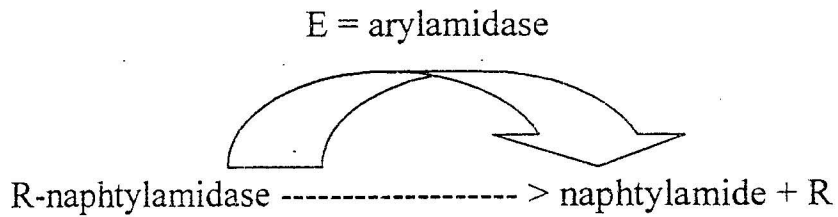
DIM : Différentiation entre *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes*; ESC: Esculine ; &MAN : & Mannosidase ; DARL : D-Arabitol ; XYL : D-Xylose ; RHA : Rhamnose ; MDG : &-Méthyl-D-Glucoside ; RIB : Ribose ; G1P : Glucose - 1 - Phosphate ; TAG : D-Tagatose . β HEM : Hémolyse .

Dans le coffret, on 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.

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

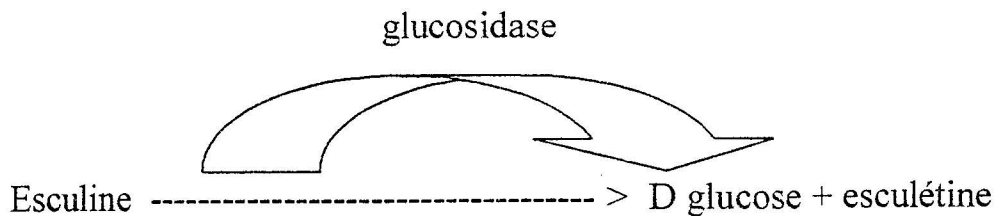
- Le test DIM est fondé sur l'hydrolyse d'un substrat naphtylamide par une arylamidase. La réaction est la suivante :



R = radicale acide aminé ; E = arylamidase .

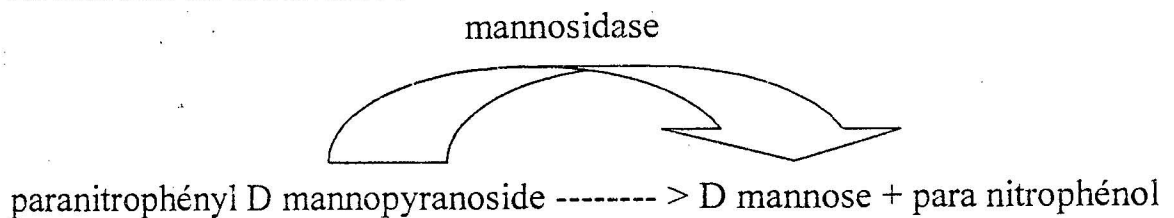
Dans la réaction, on détecte la naphtylamide , par le réactif ZYM B qui est un sel de diazonium, pour former un composé azoïque coloré en orange, et seul *Listeria innocua* possède l'arylamidase.

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



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

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



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

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

Après incubation de 18 à 24 heures à 35 - 37°C, la lecture des réactions est réalisée visuellement et interprétée en fonction du tableau XIV de lecture et d'identification, proposé par API système.

#### Mode Opérateur :

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

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

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

Sortir la galerie de son emballage d'origine et individuel et la placer dans la boîte d'incubation et se débarrasser du sachet déshydratant.

Ouvrir ensuite une ampoule de suspension Médium, puis prélever à l'aide d'une pipette, quelques colonies isolées pour réaliser une suspension d'une opacité égale à 0,5 Mac Farland.

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

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

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

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

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

### Lecture de la galerie.

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

Noter ensuite toutes les réactions positives par le signe (+) et les réactions négatives par le signe (-) sur la fiche de résultats en se référant au tableau N°XIV de lecture ci-après.

Coder par la suite les réactions obtenues en un profil numérique, les tests sont séparés par groupes de trois et une valeur de 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun comme l'indique la figure 6 en page 67.

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

L'identification est obtenue en recherchant le profil numérique dans la liste des profils qui figure ci après.

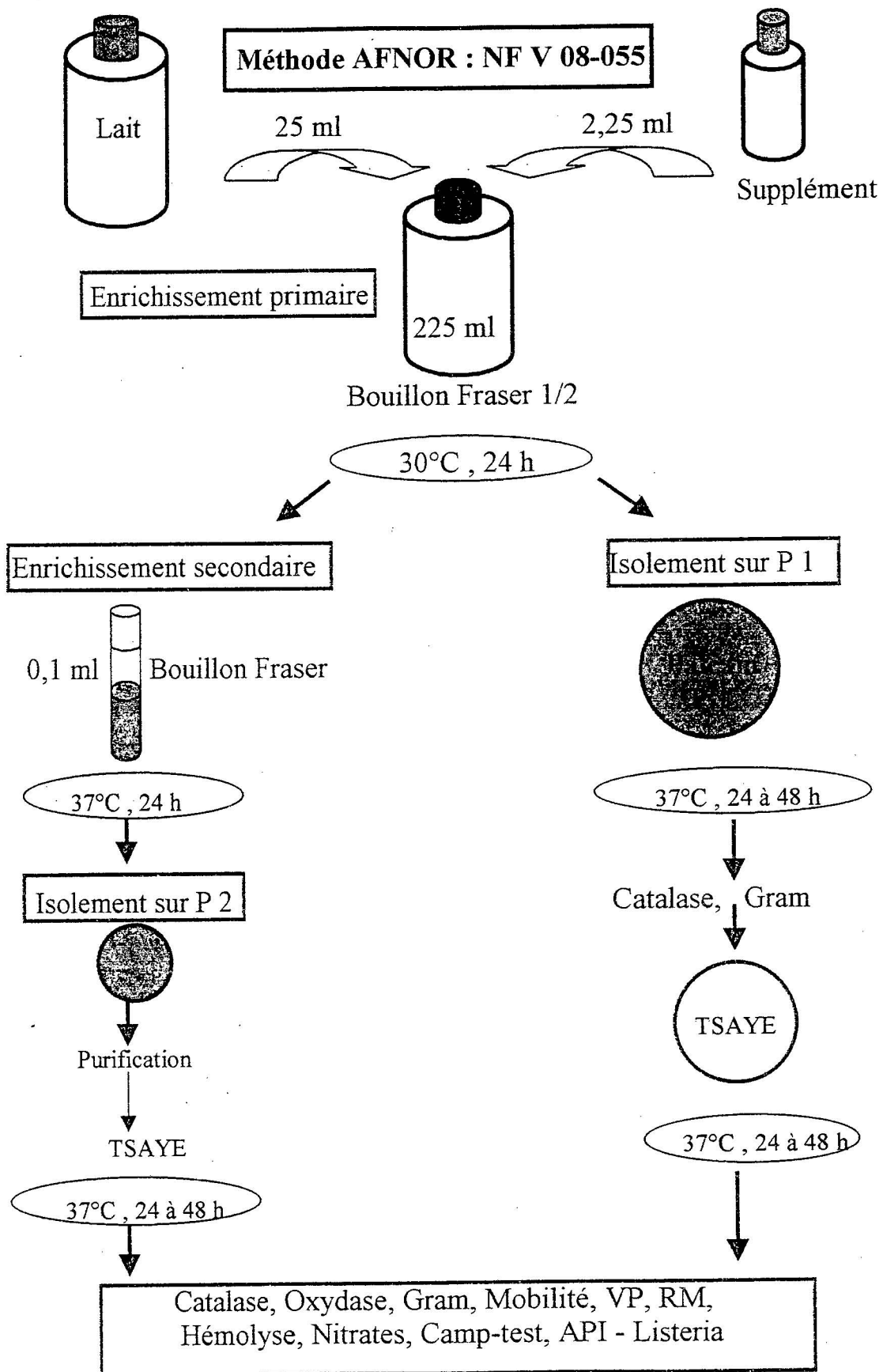
Tableau XIV : Lecture et Interprétation des caractères portés sur la galerie API *Listeria*.

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

Remarques importantes :

1. Certains auteurs préconisent l'utilisation d'une souche témoin de *Listeria monocytogenes* en même temps que l'analyse elle même et dans les mêmes conditions, ceci a pour but de contrôler toutes les étapes analytiques ainsi que les milieux de cultures utilisés, les étuves.
2. D'autres auteurs préconisent le maintien du bouillon d'enrichissement primaire pendant 7 à 8 jours à 30°C, puis d'en faire un isolement sur gélose Palcam, ceci a pour but d'augmenter les chances de retrouver surtout les *Listeria* stressées.





## LISTE DES PROFILS NUMERIQUES DES LISTERIA SUR GALERIE API

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

**PARTIE III**

**RESULTATS**

## Chapitre I : Analyse bactériologique.

### I.1. Premier lot :

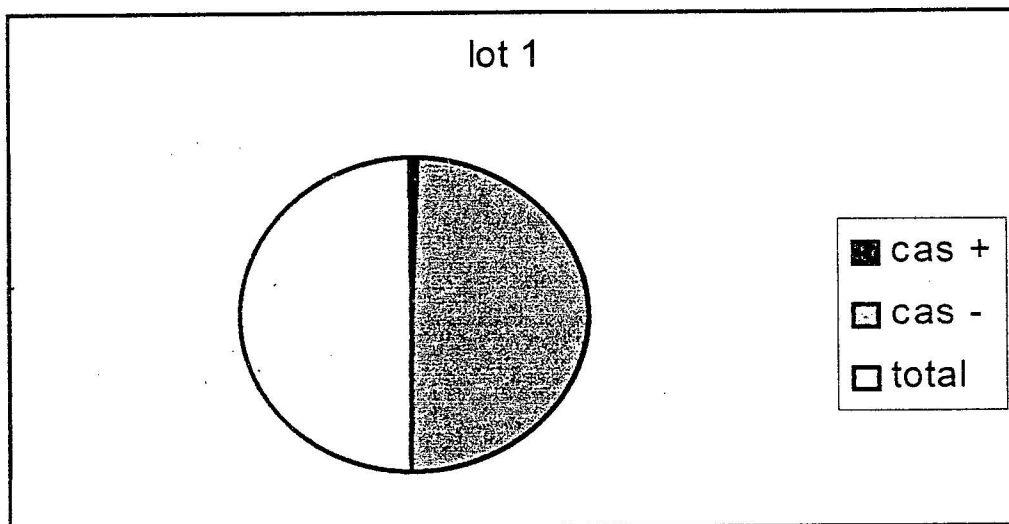
Les résultats obtenus à partir des 1432 prélèvements analysés sont rapportés dans le tableau XV ci dessous.

Tableau XV : Résultats globaux.

		1 <sup>er</sup> lot	2 <sup>ème</sup> lot	3 <sup>ème</sup> lot	Total
Cas positifs	Nombre	24	0	4	28
	%	1,86	0	50	1,96
Cas négatifs	Nombre	1263	137	4	1404
	%	98,14	100	50	98,04
Total des prélèvements		1287	137	8	1432

A partir du premier lot, sur les 1287 prélèvements analysés :

- 24 se sont révélés positifs, soit 1,86 %.
- 1263 se sont révélés négatifs, soit 98,14 %.



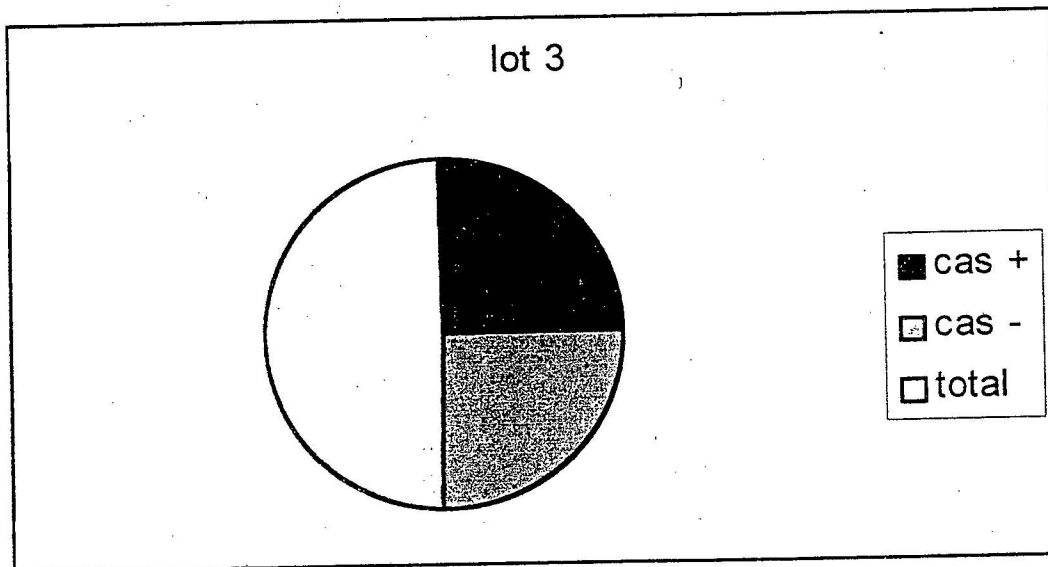
### I.2. Deuxième lot :

A partir du deuxième lot, les 137 prélèvements analysés se sont révélés tous négatifs, donc 100 %.

### I.3. Troisième lot :

En ce qui concerne le troisième lot, sur les 8 prélèvements analysés :

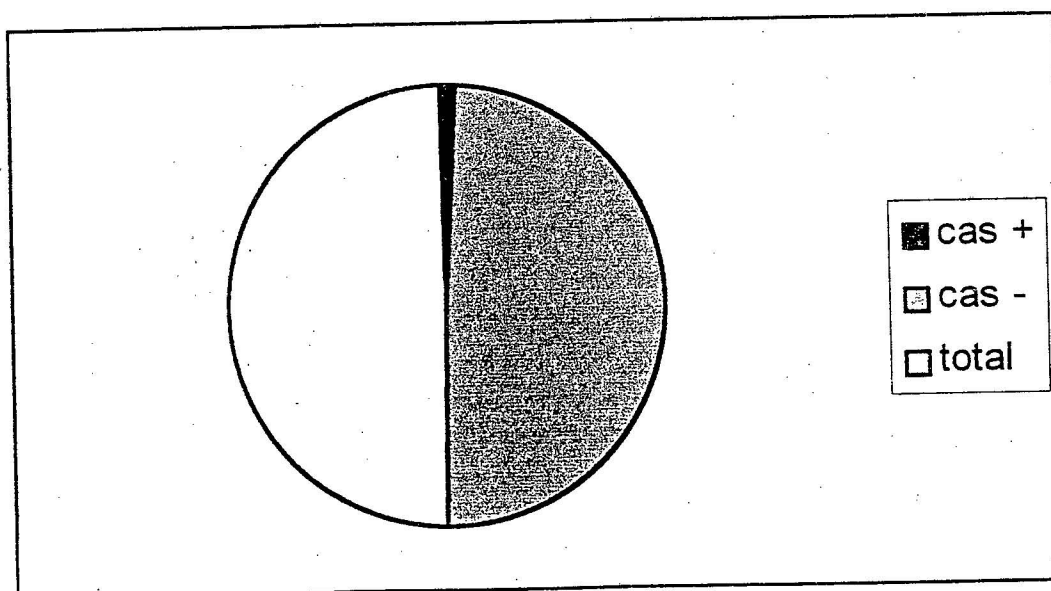
- 4 se sont révélés positifs, soit 50,0 %.
- 4 se sont révélés négatifs, soit 50,0 %.



### I.4. Résultats globaux :

Au total, 1432 prélèvements ont été analysés :

- 28 se sont révélés positifs, soit 1,96 %.
- 1404 se sont révélés négatifs, soit 98,04 %.



## Chapitre II : Répartition géographique des souches isolées.

L'origine géographique des 24 souches de *Listeria* isolées à partir du premier lot, figure dans le tableau XVI, ci-après.

Tableau XVI : Origine géographique des 24 souches isolées du 1<sup>er</sup> lot.

		Ain Defla	Birkhadem	Blida	Boudouaou	Total
Cas positifs	Nombre	6	8	4	6	24
	%	1,81	2,91	3,64	1,05	1,86
Cas négatifs	Nombre	324	267	106	566	1263
	%	98,19	97,09	96,36	98,95	98,14
Total des prélèvements		330	275	110	572	1287

Sur les 1287 prélèvements analysés, 24 souches de *Listeria* ont été isolées :

- 6 souches (soit 1,81 %) à partir des 330 prélèvements de l'exploitation de Ain Defla alors que 324 prélèvements sont négatifs (soit 98,19 %).
- 8 souches (soit 2,91 %) à partir des 275 prélèvements de l'exploitation de Birkhadem alors que 267 prélèvements sont négatifs (soit 97,09 %)
- 4 souches (soit 3,64 %) à partir des 110 prélèvements de l'exploitation de Blida alors que 106 prélèvements sont négatifs (soit 96,36 %)
- 6 souches (soit 1,05 %) à partir des 572 prélèvements de l'exploitation de Boudouaou alors que 566 prélèvements sont négatifs (soit 98,95 %).

### Chapitre III : Caractérisation biochimique.

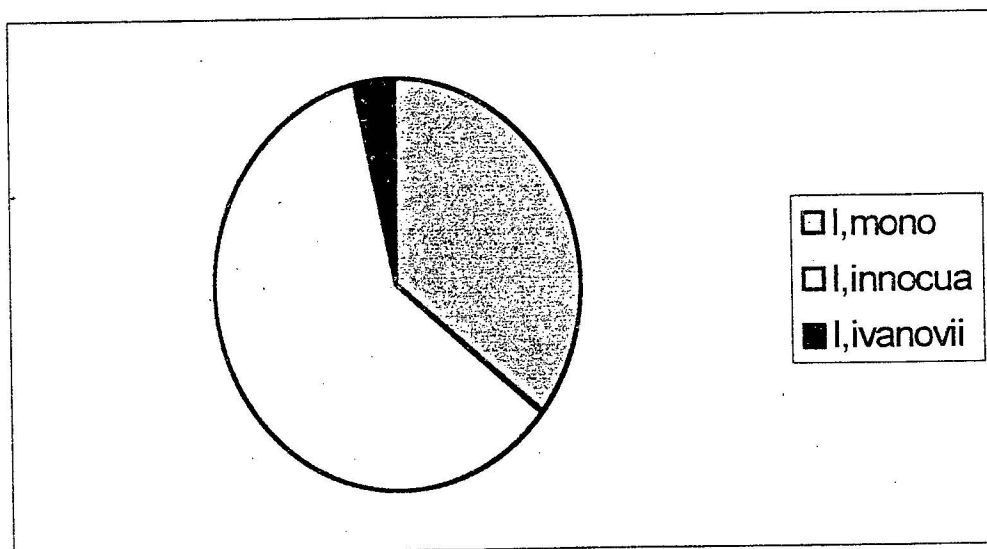
La caractérisation biochimique des 28 souches de *Listeria* isolées à partir du 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> lots est rapportée dans le tableau XVII.

Tableau XVII : Caractérisation biochimique des 28 souches de *Listeria* isolées.

	1 <sup>er</sup> lot				3 <sup>ème</sup> lot	Nombre	%
	Ain Defla	Birkhadem	Blida	Boudouaou			
<i>Listeria monocytogenes</i>	2	3	1	2	2	10	35,71
<i>Listeria innocua</i>	4	4	3	4	2	17	60,71
<i>Listeria ivanovii</i>	0	1	0	0	0	1	3,58
Total des souches isolées	6	8	4	6	4	28	100

Les résultats de l'identification biochimique des 28 souches de *Listeria* isolées caractérisent les sérotypes suivants :

- *Listeria monocytogenes* : 10, soit, 35,71 %.
- *Listeria innocua* : 17, soit 60,71 %.
- *Listeria ivanovii* : 1, soit 3,58 %.



#### Chapitre IV : Ordre chronologique des souches isolées.

L'ordre chronologique d'isolement et d'identification des 28 souches de *Listeria* en fonction de l'origine des prélèvements, figure dans le tableau XVIII ci-après.

Tableau XVIII : Ordre chronologique d'isolement des souches.

Mois d'isolement	Origine	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria ivanovii</i>
Février 2000	Ain - Defla	1	/	/
Mars 2000	Blida	1	/	/
	Boudouaou	/	1	/
Avril 2000	Ain - Defla	1	/	/
	Birkhadem	1	/	/
Mai 2000	Blida	/	2	/
	Boudouaou	/	1	/
Juin 2000	Birkhadem	/	/	1
Juillet 2000	Ain Defla	/	1	/
Octobre 2000	Blida	/	1	/
Novembre 2000	Birkhadem	1	1	/
Décembre 2000	Boudouaou	/	1	/
Janvier 2001	Ain Defla	/	2	/
Février 2001	Boudouaou	1	1	/
	Birkhadem	/	1	/
Avril 2001	Laiterie privée	2	2	/
Mai 2001	Birkhadem	1	2	/
Juillet 2001	Ain Defla	/	1	/
Août 2001	Boudouaou	1	/	/
Total des souches		10	17	1



## Chapitre V : Lysotypie.

Quant à la sérotypie des souches isolées, ne disposant pas de sérums spécifiques, nous avons adressé nos souches à trois laboratoires différents qui ont accepté volontairement cette collaboration. Les souches ont été réparties comme suit :

- Laboratoire du Chimiste Cantonal de Genève, Suisse (Service du Pr Claude Corvi) : Les 8 premières souches de *Listeria* isolées entre Février et Mai 2000 dont 4 *monocytogenes* et 4 *innocua*, en Juin 2000.
- Laboratoire de microbiologie des Denrées Alimentaires, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Liège, Belgique (Service du Pr Georges Daube), les 6 souches de *Listeria* isolées entre Juin et Décembre 2000 dont 1 *monocytogenes*, 4 *innocua* et 1 *ivanovii*, en février 2001.
- Centre National de référence des *Listeria*, Institut Pasteur de Paris, France (Service du Pr Paul Martin et du Pr Jocelyne Rocourt), les 14 souches de *Listeria* isolées entre Janvier et Août 2001, dont 5 *monocytogenes* et 9 *innocua*, en septembre 2001

Les résultats de la lysotypie sont rapportés par laboratoire, en fonction de leur origine et de leur date d'isolement dans les tableaux suivants :

Tableau IXX : Sérovars des souches typées par le laboratoire Suisse.

Origine	Date d'isolement	Identification biochimique	Nombre de souches	Sérovars
Ain - Defla	Février 2000	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Blida	Mars 2000	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Boudouaou	Mars 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a
Ain - Defla	Avril 2000	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Birkhadem	Avril 2000	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Blida	Mai 2000	<i>Listeria innocua</i>	2	6a / 6a
Boudouaou	Mai 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a

Tableau XX : Sérovars des souches typées par le Laboratoire Belge.

Origine	Date d'isolement	Identification biochimique	Nombre de souches	Sérovars
Birkhadem	Juin 2000	<i>Listeria ivanovii</i>	1	*
Ain Defla	Juillet 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a
Blida	Octobre 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a
Birkhadem	Novembre 2000	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Birkhadem	Novembre 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a
Boudouaou	Décembre 2000	<i>Listeria innocua</i>	1	6a

\* Ne disposant pas de sérums spécifiques pour les souches de *Listeria ivanovii*, le typage n'a pu être fait, une simple confirmation biochimique a été faite.

Tableau XXI : Sérovars des souches typées par le laboratoire Français.

Origine	Date d'isolement	Identification biochimique	Nombre de souches	Sérovars
Ain Defla	Janvier 2001	<i>Listeria innocua</i>	2	* / *
Boudouaou	Février 2001	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Boudouaou	Février 2001	<i>Listeria innocua</i>	1	*
Birkhadem	Février 2001	<i>Listeria innocua</i>	1	*
Laiterie privée	Avril 2001	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	4b / 4b
Laiterie privée	Avril 2001	<i>Listeria innocua</i>	2	* / *
Birkhadem	Mai 2001	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b
Birkhadem	Mai 2001	<i>Listeria innocua</i>	2	* / *
Ain Defla	Juillet 2001	<i>Listeria innocua</i>	1	*
Boudouaou	Août 2001	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	4b

\* Compte tenu de la charge de travail du Centre National de Référence des *Listeria* de l'Institut Pasteur de Paris d'une part, et du peu d'intérêt de la lysotypie des souches autres que *Listeria monocytogenes* d'autre part, le typage des souches *Listeria innocua* n'a pas été jugé utile, surtout que cette dernière n'est pas considérée comme pathogène.

La lysotypie des souches a révélé les résultats suivants :

- Les 10 souches de *Listeria monocytogenes* ont toutes été confirmées et possèdent toutes le serovar 4b,
- Les 17 souches de *Listeria innocua*, ont toutes été confirmées biochimiquement et seulement 8 d'entre elles ont été typées serovar 6a.
- La souche de *Listeria ivanovii* n'a pas été typée par manque de sérum spécifique.

**PARTIE IV**

**DISCUSSION**

## Chapitre I : Méthode d'analyse.

Notre étude s'est donc attachée d'abord et en premier lieu, au choix, à la mise en place et à la maîtrise d'une méthodologie de recherche, d'isolement et d'identification de ce germe.

Qu'il s'agisse de lait cru ou d'une autre denrée, le problème que pose actuellement la technique de recherche des *Listeria* se trouve confronté au choix d'une technique de référence réalisable dans nos conditions de travail, ayant comme principaux critères :

- Rapidité,
- Sensibilité,
- Spécificité,
- Fiabilité,
- Faible coût.

La solution est relativement simple lorsque les *Listeria* sont abondantes dans le prélèvement à analyser : un simple isolement sur un milieu sélectif suffit parfois pour les récupérer. Or, dans la majorité des cas, lorsqu'il s'agit d'analyses de laits crus, le problème ne se pose pas de la même façon : les *Listeria* sont généralement en petit nombre et elles sont accompagnées d'une flore associée et abondante. C'est le cas également de certains fromages où le microbiologiste cherche à mettre en évidence une ou plusieurs cellules de *Listeria* dans 25 grammes de fromage contenant une flore lactique très abondante ; il se trouve alors confronté au problème de la compétition microbienne.

A cet effet, certaines méthodes d'enrichissement sélectif s'imposent, mais prolongent nécessairement et de façon systématique les délais de réponse, souvent incompatibles avec la durée de vie de certains aliments.

Dans ces cas, il faut avoir recours aux techniques rapides comme la technique RapidL' mono, qui ne sont pas forcément aussi fiables et peut être même, moins sélectives que la méthode AFNOR. De plus, beaucoup d'entre elles nécessitent une confirmation par cette dernière.

Le choix de la méthode AFNOR : NF. V 08-055 est justifié pour les raisons suivantes :

- méthode de référence, homologuée et validée,
- elle permet une sélection performante des *Listeria* grâce aux suppléments utilisés,
- elle permet également la récupération des *Listeria* dans les produits alimentaires présentant une poly-contamination importante,

- elle permet la croissance des Listeria "stressées" par des conditions liées au produit (acidité du lait),
- elle est fiable, sensible et rapide,
- elle est moins coûteuse par rapport aux autres techniques,
- **tout résultat trouvé positif par une autre méthode doit être confirmé par la méthode AFNOR, pour l'isolement du germe,**
- disponibilité des milieux de culture, réactifs et galerie biochimique à l'Institut Pasteur d'Algérie.

## Chapitre II : Analyse bactériologique.

### II.1. Premier lot :

Les résultats des 1287 prélèvements traités au cours de l'enquête menée dans la région ont révélé :

- 24 cas positifs, soit 1,86 %.
- 1263 cas négatifs, soit 98,14 %.

Nos résultats :

- d'une part, sont similaires à ceux rapportés :
  - En France par J. Rocourt (1994) et J.P Larpent (1995), soit 2,30 % et 1,90 %, respectivement ;
  - En Espagne par J.M Soriano (2000), soit 2,90%.
- d'autre part, ils confirment la présence des *Listeria* en Algérie mais aussi leur rareté.

Les travaux de C.Lahellec et B.Lombard (AFSSA, 2000) ont permis de constater que dans le cadre de la technique AFNOR, et particulièrement lors de l'identification biochimique, il est quelque fois impossible de faire la distinction entre les différentes espèces de *Listeria*. Cela est d'autant plus marqué, que la compétition existante entre la croissance de *Listeria monocytogenes* et *Listeria innocua* est souvent à l'avantage de *Listeria innocua*.

Cependant à nos jours, il n'existe pas de meilleure alternative. Des améliorations pourraient être réalisées en utilisant des géloses chromogènes permettant de faire d'emblée, la distinction entre *Listeria monocytogenes* et les autres espèces (37,64).

Nos résultats se répartissent comme suit :

- Ain Defla, 6 souches sur 330 prélèvements dont :
  - 2 *Listeria monocytogenes*,
  - 4 *Listeria innocua*.
- Birkhadem, 8 souches sur 275 prélèvements dont :
  - 3 *Listeria monocytogenes*,
  - 4 *Listeria innocua*.
  - 1 *Listeria ivanovii*.
- Blida, 4 souches sur 110 prélèvements dont :
  - 1 *Listeria monocytogenes*,
  - 3 *Listeria innocua*.
- Boudouaou, 6 souches sur 572 prélèvements dont :
  - 2 *Listeria monocytogenes*,
  - 4 *Listeria innocua*.

Au total :

- 8 souches de *Listeria monocytogenes*,
- 17 souches de *Listeria innocua*,
- 1 souche de *Listeria ivanovii*.

## II.2. Deuxième lot :

Les résultats des 137 prélèvements reçus n'ont montré aucun cas positif.

## II.3. Troisième lot :

Les résultats, de l'enquête effectuée dans la laiterie privée où *Listeria monocytogenes* a été diagnostiquée à partir de produits finis (fromages à base de lait cru), les 8 prélèvements ont révélé :

- 4 cas positifs, soit 50,0 % dont :
  - 2 *Listeria monocytogenes*,
  - 2 *Listeria innocua*
- 4 cas négatifs, soit 50,0%

Nos résultats ont donc confirmé et situé la source de contamination.

De nos jours, on parle de plus en plus de notions de **colonisation d'ateliers** : nouvelle donnée en ce qui concerne l'interprétation des analyses microbiologiques en industrie agro-alimentaire (cf. prophylaxie dans les industries page 56).

De plus, pour mieux s'adapter aux exigences à la fois des éleveurs, des industriels et surtout des consommateurs, il est impératif et même urgent de mettre en place les systèmes HACCP en entreprise. Ces derniers, fondés sur la maîtrise des points critiques élimineront au moment opportun, toute matière première et particulièrement le lait cru s'il est contaminé par *Listeria* ou un autre microorganisme pathogène.

## II.4. Résultat global :

**Le résultat global de notre étude a montré :**

- **28 cas positifs, soit 1,96 %.**
- 1404 cas négatifs, soit 98,04 %.

Ce taux de 1,96 %, loin d'être négligeable, est en conformité avec ceux rapportés par la littérature (46, 62). Il prouve **la présence de *Listeria monocytogenes*, pathogène pour l'homme et l'animal**, ce qui signifie qu'on n'est pas à l'abri d'une éventuelle flambée épidémique avec toutes les conséquences qui s'en suivent, en particulier, celle relative à la mortalité chez l'homme qui est de 25 à 30 % (J. Rocourt, 1994).

**Listérioses animale et humaine** offrent beaucoup de similitudes :

- Toutes deux proviennent essentiellement de contaminations alimentaires.
- Toutes deux présentent également la même symptomatologie dominée par des avortements et des accidents périnataux et encéphaliques .

De nos jours, on est donc bien conscient que la listériose est une maladie rare, mais grave. **La vigilance doit donc être de règle.**

Les accidents épidémiques dus à *Listeria monocytogenes* sont parfois graves, souvent spectaculaires et concernent des catégories bien précises de la population, à savoir les personnes âgées, les enfants, les femmes enceintes et les immunodéprimés.

**Listeria est ubiquiste** et la prévention ne peut malheureusement reposer que :

- sur l'information des consommateurs d'une part,
- sur la qualité microbiologique des aliments (mode de fabrication, de transport, de stockage et de consommation) d'autre part,

Si on essaie d'être de plus en plus vigilant en ce qui concerne l'absence de *Listeria* dans les aliments consommés par l'homme, l'animal en revanche, herbivore en particulier, est directement au contact des bactéries environnementales par l'herbe qu'il ingère.

Pour cela, un contrôle bactériologique systématique s'impose et concerne à la fois les matières premières locales et/ou importées, les chaînes de fabrication et les produits finis d'origine publics et privés.

Par ailleurs, il va sans dire, qu'en matière de coût, une épidémie de Listériose coûterait certainement plus cher à l'état, que des actions de prévention. L'exemple du dernier épisode de Botulisme survenu en été 1999, en est témoin.



### Chapitre III : Lysotypie.

Les résultats de cette étude montrent que 100 % des souches de *Listeria monocytogenes* isolées possèdent le sérovar 4b. Ce dernier a été mis en évidence dans 10 souches parmi les 28 isolées, soit 35,7 %. Il s'agit du sérovar le plus incriminé dans les cas de Listériose humaine et animale.

En France, la lysotypie est d'intérêt limité puisque plus de 95 % des souches isolées des infections cliniques appartiennent au sérovar 1/2a, 1/2b ou 4b. Il n'y a pas de rapport entre un sérovar particulier et son origine géographique et animale (62).

Presque la moitié des souches de *Listeria innocua*, possèdent le sérovar 6a qui n'est pathogène ni pour l'homme, ni pour l'animal d'où le peu d'intérêt à son typage.

Par contre, bien que pathogène surtout pour les ovins et caprins, la souche de *Listeria ivanovii* n'a pas été typée par manque de sérum spécifique.

A partir de ces résultats, une question très préoccupante reste posée : **S'agit-il de sérovars locaux ou de sérovars importés ?**

Beaucoup d'investigations restent, à notre avis, à prévoir dans ce sens pour établir réellement la situation épidémiologique dans notre pays.

**PARTIE V**

**CONCLUSION**

## Conclusion.

Bien que rares mais graves, les épidémies de listériose constituent toujours un problème majeur aussi bien en santé animale qu'en santé publique. Elles se caractérisent par un taux de mortalité assez important et, à ce titre, elles nécessitent une grande vigilance de la part des vétérinaires, des médecins, des hygiénistes et des industriels et surtout les consommateurs.

Comme la majorité des cas humains, résulte de l'ingestion d'aliments et en particulier de lait cru, des mesures urgentes doivent être mises en œuvre en vue d'améliorer leur qualité hygiénique.

De ce fait, et à l'instar de ce qui se passe au niveau mondial, notre pays a tout intérêt à mettre en place des systèmes de surveillance épidémiologique, surtout que la majorité de notre alimentation provient de pays endémiques.

L'absence totale de *Listeria* dans les denrées alimentaires reste illusoire et une réglementation doit être aussi bien instaurée que respectée. Sinon, il convient alors de faire un choix entre accepter de manger des aliments éventuellement faiblement contaminés ou ne consommer que des denrées alimentaires stérilisées ou cuites à haute température et dans ce cas, il faut bannir de son alimentation les crudités, le lait cru, les produits au lait cru, les salaisons et les poissons fumés. Cette dernière attitude doit par contre, être respectée par les femmes enceintes, les individus immunodéprimés et les personnes âgées. Ces mesures apparaissent excessivement contraignantes pour les personnes en bonne santé qui, à condition de veiller aux bonnes règles d'hygiène des aliments courent un risque minime.

Nos travaux ont montré la présence de *Listeria*, particulièrement *Listeria monocytogenes*, à des taux certes faibles, tout comme le rapporte la littérature, cependant une flambée épidémique n'est pas à exclure.

A cet effet, beaucoup de précautions restent à prendre aussi bien en élevage qu'en industrie.

Le dépistage et l'abattage systématique de tous les bovins porteurs sains de *Listeria* doit être préconisé, dans le but de lutter contre ce fléau et de limiter le nombre de foyers infectieux qui véhiculent le germe constituant ainsi les principaux vecteurs de transmission de la maladie.

Enfin, l'éradication totale de la listériose reste illusoire, toutefois, la prophylaxie demeure à notre avis l'unique moyen de lutte et de protection.

# **PARTIE IV**

# **RECOMMANDATIONS**

## **Recommandations.**

A l'issue de ce travail, nos principales recommandations sont les suivantes :

1. Poursuite de l'enquête de listériose et l'étaler à d'autres régions du pays,
2. Standardisation de la technique de recherche à l'échelon national,
3. Mise en place de techniques rapides de type RapidL' mono surtout dans les élevages à risques ou à forte suspicion,
4. Mise en place de la méthode de dénombrement des Listeria particulièrement dans les cas d'épidémies,
5. Etude de la sensibilité des souches isolées vis à vis des antibiotiques,
6. Mise en place de la sérotypie des souches isolées particulièrement dans les cas des épidémies de listériose humaine et animale,
7. Création d'un centre national de référence des Listeria,
8. Mise en place de dispositifs officiels de surveillance épidémiologique, à l'instar de ce qui se passe en Europe, aux USA, et au Canada, dispositifs qui permettent d'anticiper l'apparition de cas humains ou animaux,
9. Dépistage précoce dans tous les cas d'avortements chez les femmes et mise en place d'enquêtes au niveau des services de maternité,
10. Dépistage précoce des animaux porteurs sains au niveau des élevages intensifs de bovins laitiers modernes, à partir du lait, des selles
11. Dépistage à partir de l'environnement (alimentation : ensilage ) ,
12. Dépistage à l'importation, au niveau des lazarets, surtout lorsqu'il s'agit d'importation d'animaux, à partir de pays endémiques,
13. Dépistage à l'importation de denrées animales et d'origine animale, surtout lorsqu'il s'agit d'importation, à partir de pays endémiques,
14. Enquêtes régulières au niveau industriel, particulièrement au niveau des industries laitières,
15. Informer les consommateurs sur la gravité de la listériose, particulièrement les femmes enceintes,
16. Insister toujours auprès des éleveurs et des industriels sur les niveaux d'hygiène requis,
17. Informer les éleveurs, sur les risques encourus par la distribution d'ensilage mal conservé, contaminé, et contenant des mottes de terre,
18. Sensibiliser les éleveurs et les industriels sur la mise en place de systèmes HACCP le plus rapidement possible et dans les meilleures conditions,
19. Abattage systématique des bovins atteints de listériose car ils constituent des réservoirs permanents,
20. Sensibiliser d'avantage les vétérinaires praticiens sur les demandes de recherche des Listeria particulièrement dans les cas d'avortements et de méningites ou méningo-encéphalites ,

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Andre (p), Devleeschouwer (d) et Dony (j). Contamination des aliments par *Listeria monocytogenes* : évaluation de la situation et étude d'améliorations techniques dans la fabrication. File://A:\Risques pour la santé liés à l'alimentation .1995, pp 1-3 .
2. Andre (p), Roose (h) et Van Noyen (r). Listériose neuro-méningée associée à la consommation de crème glacée. Médecine et maladies infectieuses. vol 20 , 1990 , pp 570–572 .
3. Anonyme. Detection of *Listeria monocytogenes*. file://A:\ detection\_of\_listeria\_monocytogenes.htm . 2000 , pp 1-2.
4. Anonyme. *Listeria monocytogenes* et aliments réfrigérés. Institut International du Froid. file://A:\ *Listeria monocytogenes* dans les aliments réfrigérés.htm 1998, pp 1-3.
5. Anonyme. La listériose animale et humaine – épidémiologie. file://A:\ Les *Listeria* en Agro-Alimentaire.2\_fichiers\listeriose.htm . 2000, pp 1-6.
6. Anonyme. Listeriose : *Listeria monocytogenes* – Historique des principales infections. file://A:\ LISTER.html . 2000 , pp 1-4.
7. Anonyme. *Listeria monocytogenes*. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxines Handbook. Hypertext last updated by mow/ear/xxz. 1999, pp 1-2.
8. Anonyme. Listeriose : Zoonose. file://A:\ listeriose.htm . 2000, pp 1-5.
9. Anonyme. Méthodes d'isolement, de recherche et d'identification des *Listeria*. file://A:\ methodes bis\_fichiers\identification.htm. 2000 , pp 1-6.
10. Anonyme. Outbreak of Listeriosis Associated With Homemade Mexican-Style Cheese North Carolina, October 2000–January 2001 (2) .htm. Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Editorial note. vol 286, n°6, August 2001, pp 2-5.
11. Anonyme. Prévention et éradication de la listériose. file://A:\ prevention\_fichiers\prevention.htm. 2000, pp 1-3.
12. Anonyme. Strategies for Addressing *Listeria monocytogenes*. file://A:\FSIS Strategies for Addressing *Listeria monocytogenes*.htm. 1999, pp 1-2.

13. Asperger(h), Heistingner(h), Wagner(m), Lehner(a) and Brandi(e). A contribution of *Listeria* enrichment methodology-growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning, enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. Food microbiology. vol 16, 1999, pp 419-431.
14. Aubertin(j), Gin(h). Listériose humaine. Annales de la Société Belge de Médecine tropicale. vol 67, n°1, 1987, pp 140-149.
15. Audurier(a) et Berche(p). *Listeria*. Bactériologie médicale : Le Minor, deuxième édition. 1989, pp 844-854.
16. Audurier(a), Rocourt (j) et Courtieu(al). Isolement et caractérisation de *Listeria monocytogenes*. Annales de microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris. vol 128A, 1977, pp 185-198.
17. Augustin(jc). Résistance de *Listeria monocytogenes* aux traitements thermiques. Pathologie Biologie. vol 44, n°9, 1996, pp 790-807.
18. Avril(jl). Bactériologie clinique. Troisième édition. Editions : Ellipse. 2000, pp 140-150.
19. Baylon(h). Recrudescence des Listérioses. Médecine et nutrition. vol 6, Tome : XXIII, 1987, pp 399-401.
20. Barnier(e), Vincent(jp), Catteau(m). Survie de *Listeria monocytogenes* dans les saumures et le sérum de fromagerie. Sciences Alimentaires. vol 8, 1988, pp 175-178.
21. Barnier(e), Vincent(jp) et Catteau(m). *Listeria* et environnement industriel. Sciences Alimentaires. vol 8, 1988, pp 239-242.
22. Bazin(c). Méningites et méningo-encéphalites à *Listeria*. Revue du Praticien. vol 31, 1981, pp 2387-2402.
23. Bellouni(r). *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en médecine - DESM, INESSM - Alger. 1990, pp 1-165.
24. Berche(p), Gaillard(jl) et Simonet(m). *Listeria monocytogenes*. Précis de bactériologie. Les bactéries des infections cliniques. vol 3, 1988, pp 312-320.



25. Berche(p). Physiopathologie des infections à *Listeria monocytogenes*. Médecine et Maladies Infectieuses. n°25 Spécial, 1995, pp 197-209.
26. Berche(p). Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. Infections Néonatales II. vol 2, n°1, 1999, pp 33-39.
27. Bienfet(v), Lomba(f), et Binot(h). Une affection en recrudescence ou trop souvent méconnue ? L'encéphalite à *Listeria monocytogenes*. Annales de médecine vétérinaire. fascicule VI, Tome 113, 1969, pp 345-357.
28. Bind(jl). Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en industries agro-alimentaires. Recueil du Séminaire CPCIA. 1990, pp 55-76.
29. Bind(jl). Mise en évidence et dénombrement des *Listeria* à partir de produits laitiers. Le Lait. n°71, 1991, pp 99-105.
30. Bind(jl), Avoyne(c), et Delaval(p). Analyse critique des méthodes d'isolement, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en agro-alimentaire. Pathologie Biologie. vol 44, n°9, 1996, pp 757-768.
31. Blancher(g). Epidémiologie et prophylaxie des listérioses. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine. vol 184, n°2, 2000, pp 261-265.
32. Blood(h). Médecine Vétérinaire. Deuxième édition : Vigot Frères Paris. 1976, pp 351-354.
33. Bohnert(m), Dilasser(f), et Dalet(c). Les microorganismes contaminants dans les industries agro-alimentaires : colonisation, détection et maîtrise. Colloque de la Société Française de Microbiologie. 1991, pp 111-117.
34. Bosgiraud(c), Menudier(a) et Champagnol(mp). Etude épidémiologique de la distribution des espèces de *Listeria* et des sérotypes de *Listeria monocytogenes* en pathologie humaine, animale et dans les aliments. Revue de Médecine Vétérinaire. vol 142, 1991, pp 463-468.
35. Catherine(e) et Adams(ph). *Listeria* - The organism and the disease. <file:///A:/listeria--the organism and the disease.htm>. 2000, pp 1-5.
36. Catteau(m). Le Genre *Listeria*. Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires. vol 3, 1991, pp 315-323.

37. Carles(b), Jacquet(c), Duthoit(l), Facon(jl) et Rocourt(j). 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. 1998, pp 1-22.
38. Cossart(p). Bases génétiques et moléculaires du pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes*. Médecine et maladies infectieuses. n°25 spécial, 1995, pp 210-218.
39. Cox(lj). Les microorganismes contaminants dans les industries agro-alimentaires : colonisation, détection et maîtrise. Colloque de la Société Française de Microbiologie. 1991, pp 19-34.
40. David(j). The role of science in international food standards. Food Control. vol 11, 2000, pp 181-194.
41. Elmer(h). Standard Methods for the examination. American Office Health Association. Quatorzième édition, 1972, pp 1-416.
42. Espaze(ep), Rocourt(j) et Courtieu(al). La listériose en France en 1988. Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. n°1, 1990, pp 1-2.
43. Espaze(ep), Rocourt(j) et Courtieu(al). La listériose en France en 1988. Etude à partir des souches adressées au Centre National de Référence. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. n°3, 1991, pp 9-10.
44. Espinasse(j). Pathologie liée à l'alimentation par l'ensilage de maïs chez les ruminants. Recueil de Médecine Vétérinaire. vol 143, 1973, pp 1271-1282.
45. Eunice(t). HACCP in small companies : benefit or burden ? Food Control. n°12, 2001, pp 217-222.
46. Euzéby(jp). Bactériologie Vétérinaire : *Listeria*. [www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html](http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html). 25 Juin 2000, pp 1-35.
47. Fabiani(g), Marsoin(j), Cartier(f), et Cormier(m). Recherche par coproculture des porteurs de *Listeria* chez les transplantés rénaux. Médecine et Maladies Infectieuses. vol 6, 1976, pp 15-20.
48. Fernandez Garayzabal(jl), Dominiguez Rodriguez(l) et Vazquez Boland (ja). *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. Microbiologia 83. vol 1, 1985, pp 293-294.

49. Gaudot(c). Prophylaxie des listérioses. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. vol 184, n°2, 2000, pp 287-294.
50. Gitter(m), Bradley(r). *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. The Veterinary Record. n° 25, 1980, pp 193-194.
51. Goyon(m), Lecomte(s). Avortement à *Listeria monocytogenes* chez la vache. Recueil de médecine vétérinaire. Tome CXXXIII, 1957, pp 647-654.
52. Goulet(v), Rocourt(j) et Rebiere(i). Listeriosis outbreak associated with the consumption of Rillettes in France in 1993. The Journal of Infectious Disease. n°177, 1998, pp 155-160.
53. Goulet(v), Brohier(s). La Listériose en France en 1986 : recensement auprès des laboratoires hospitaliers. Pathologie Biologie. n°37, 1989, pp 206-211.
54. Henriette de Valk, Vaillant(v), et Goulet(v). Epidémiologie des listérioses humaines en France. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. Vol 184, n°2, 2000, pp 267-274.
55. Hirsh(m). Rapport d'activités de l'AFSSA : 1999. 2000, pp 1-223.
56. Hubert(b), Laporte(a), Lepoutre(a) et Roure(c). La surveillance des maladies transmissibles en France. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire. n°36, 1991, pp 155-157.
57. Hubert(b). L'actualité sur les infections d'origine alimentaire en France en 1994. Annales de l'Institut Pasteur de Paris. vol 5, n°3, 1994, pp163-167.
58. Jacquet(ch). *Listeria* et listériose humaine. Microbiologie alimentaire. Tome II, 1996, pp 21-44.
59. Jouve(jl). La qualité microbiologique des aliments : maîtrise et critères. Editions : Polytechnica. 1993, pp 1-393.
60. Journal officiel de la république française. Guide Législatif et Réglementaire. DGAL/SDHA n°8155 du 12 Décembre 2000. Critères microbiologiques applicables aux aliments. 2001, pp 1-15.
61. Lahellec(c), Salvat(g) et Brisabois(a). Incidence des *Listeria* dans les denrées alimentaires. Pathologie Biologie. vol 44, n°9, 1996, pp 808-815.

62. Larpent(jp). Les Listeria : Technique et documentation. Edition : Lavoisier. Février 1995, pp 1-140.
63. Lebres(e), Mouffok(f). Enquête de listériose en Algérie. Recueil de la journée : Institut Pasteur d'Algérie face aux problèmes sanitaires de l'été. 2000, pp11-22.
64. Leclerc(v), Vincent-Racé(c) et Danan(c). Recherche et dénombrement de *Listeria monocytogenes* : critères microbiologiques et méthodes. Sixth conference in food microbiology. vol 6, 21-22 Juin 2001, pp 62-72.
65. Lecoanet(j). Aspects actuels de la listériose des ruminants en France. Recueil de médecine vétérinaire. vol 149, 1973, pp 1283-1291.
66. Le Minor(l), Veron(m). Le Genre Listeria. Bactériologie Médicale. vol 33, 1973, pp 559-569.
67. McKellar(rc). Use of the Camp test for identification of *Listeria monocytogenes*. Applied and environmental microbiology. vol 60, n°12, 1994, pp 4219-4225.
68. Monnet(p). Place de la listériose en matière d'états septiques néo-nataux. Médecine et maladies infectieuses. n° 6, 1976, pp 471-473.
69. Nicolas(ja). La listériose animale. Revue de médecine vétérinaire. vol 137, 1986, pp 645-650.
70. Nicolas(ja), Vidaud(n). Contribution à l'étude de Listeria dans les denrées d'origine animale destinées à l'alimentation humaine. Recueil de médecine vétérinaire. vol 163, 1987, pp 283-285.
71. Nicolas(ja), Espaze(ep), Rocourt(j) et Cornuejols(mp). Listériose animale et ensilage, intérêt de la sérotypie dans l'approche épidémiologique. Recueil de Médecine Vétérinaire. vol 164, 1988, pp 203-206.
72. Norme Internationale ISO : 10560. Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les laits et produits laitiers. 1990, pp 1-19.
73. Norme AFNOR. NF.V 08-055. Recherche de *Listeria monocytogenes*. 1997, pp 1-25.
74. Normes nationales : Arrêté interministériel n°35 du 27 Mai 1998, fixant les critères microbiologiques de certaines denrées alimentaires. 1998, pp 7-25.

- 75.OMS Genève. Food safety issues : Human listeriosis : 1991 - 1992. 1992, pp 1-47.
- 76.OMS / FAO. Evaluation du risque microbiologique dans les aliments. 1999, pp 1-22.
- 77.Oteng-Gyang(k). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chauds. Editions : Lavoisier. 1984, pp 1-259.
- 78.Pedro(j), Panisello-Roisin(r), et Peter (c). Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems. International Journal of Food Microbiology. vol 59, 2000, pp 221-234.
- 79.Pierre(v), Le Quellec Nathan(m), et Coquin(y).La prophylaxie des listérioses. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. vol 184, n°2, 2000, pp 295-303.
- 80.Ramdani - Bouguessa(n), Rahal(k). Neonatal listeriosis in Algeria : the first two cases. Clinical microbiology and infection. vol 6, n°3, 2000, pp 108-111.
- 81.Rocourt(j), Schrettenbrunner(a), et Seeligerhpr). Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes* sensu stricto. Annales de microbiologie de Institut Pasteur de Paris. vol 134A, 1983, pp 65-71.
- 82.Rocourt(j), Jacquet(c). Epidémiologie des infections humaines à *Listeria monocytogenes* en 1994 : certitudes et interrogations. Annales de microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris / Actualités. vol 5, n° 3, 1994, pp 168-174.
- 83.Rocourt(j), Bille(j). Foodborne listeriosis. Rapport trimestriel des statistiques sanitaires mondiales. vol 50, 1997, pp 67-73.
- 84.Rocourt(j), Renaud(f) et Freney(j). Les Listeria. Manuel de bactériologie clinique. vol III, 1994, pp 833-847.
- 85.Rocourt(j), Cossart(p). *Listeria monocytogenes*. Foodborne pathogenic bacteria. Editions Michael P.Doyle. vol 5, 1998, pp 337-352.
- 86.Rocourt(j). Listériose humaine : Aspects cliniques et épidémiologiques, rôle de l'alimentation. Recueil des Journées internationales de l'APDILA, session contrôle des aliments. 1998, pp 29-40.

87. Rocourt(j). The recognition and identification of *Listeria* species by classic methods. Turkish Journal of infection. vol 2, n°4, 1998, pp 471-485.
88. Rocourt(j). *Listeria* et listériose : Position phylogénétique et classification du genre *Listeria*. Précis de bactériologie clinique. vol 46, 2000, pp 943-952.
89. Rocourt(j). Taxonomie du genre *Listeria* et typage de *Listeria monocytogenes*. Pathologie biologique. vol 44, n°9, 1996, pp 749-756.
90. Rocourt(j). Rapport d'activités du centre national de référence des *Listeria* : Institut Pasteur de Paris. 1999, File://A:\Listeria 3333.htm. pp 1-2.
91. Rocourt(j). Virulence de *Listeria monocytogenes*. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. vol 184, n°2, 2000, pp 305-307.
92. Schlech(wf). Pathogenesis and immunology of *Listeria monocytogenes*. Pathologie biologique. vol 44, n° 9, 1996, pp 775-782.
93. Shwarzkopf(a). *Listeria monocytogenes* – Aspect of pathogenicity. Pathologie biologique. vol 44, n°9, 1996, pp 769-774.
94. Shaynoor(d), Cossart(p). Le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes*. Annales de l'Institut Pasteur de Paris. vol 5, n°3, 1994, pp 202-211.
95. Soboleva(tk), Pleasants(g) and Roux(n). Predictive microbiology and food safety. International Journal of food Microbiology. vol 57, 2000, pp 183-192.
96. Soriano(jm), Rico(h), Molto'jc) and Manes(j). *Listeria* species in raw and ready to eat foods from restaurants. Journal of foods protection. vol 64, n°4, 2001, pp 551-553.
97. Stahl(v), Garcia(e), Hezard(b) et Fassel(c). Maîtrise de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans les exploitations laitières et l'industrie fromagère. Pathologie biologique. vol 44, n°9, 1996, pp 816-824.
98. Stewart(e). *Listeria monocytogenes*. <file://A:\Listeria monocytogenes-I.htm> 2000, pp 1-3.
99. Struillou(l), Raffi(f). Listérioses. Encyclopédie : Médecine et maladies infectieuses. vol B-017-R-10 , 1997, pp 1-10.
100. Sutra(l). *Listeria monocytogenes*. Manuel de bactériologie alimentaire. 1998, pp 133- 162.

101. Vallée(a), Guillon(jc) et Levaditi(j). Aspect actuel de la listériose cérébrale bovine en France. Bulletin de l'Académie vétérinaire. Tome CXLVIII, 1972, pp 277-282.
102. Vaissaire(j). Epidémiologie des Listérioses animales en France. Bulletin de l'Académie nationale de médecine. vol 184, n°2, 2000, pp 275-286.
103. West(hj), Obwolo(m). Bilateral facial paralysis in a cow with listeriosis. The veterinary record. vol 120, 1987, pp 204-205.
104. William(c), Rebhum (dmv) and DeLahunta(a). Diagnosis and treatment of bovine listeriosis. Journal of the american veterinary medical association. vol 180, n°4, 1982, pp 396-398.
105. William(c), Rebhum(dmv). Listeriosis : Bovine neurologic disease. Veterinary clinics of North America : Food animal practice. vol 3, n°1, 1987, pp 75-83.
106. Willis(m), Schoonderwoerd(m). A case bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. Canadian veterinary journal. vol 31, 1990, pp 773-775.

# ANNEXES



## Annexe : 1

### 1. Matériel de travail

#### ➤ *Equipements de laboratoire*

Il s'agit en somme, des équipements classiques d'un laboratoire de microbiologie alimentaire à savoir :

- Etuves bactériennes réglées à différentes températures : 30 et 37 °C,
- Bain-marie réglé à 44°C,
- Hotte à flux laminaire,
- Autoclave : 120°C,
- Balance électronique : environ 100 gr
- Combiné : Réfrigérateur - Congélateur,
- Microscope optique binoculaire, grossissement : 40 et 100,
- Bec bunsen.

#### ➤ *Consommable*

- Milieux de culture (dont les formules figurent en annexe 2),
  - Bouillon Fraser avec supplément,
  - Gélose Palcam avec supplément,
  - Gélose au Sang,
  - Gélose TSAYE,
  - Gélose mobilité,
  - Gélose TSA,
  - Gélose de conservation,
  - API - Listeria,
  - Huile de cèdre.
- Réactifs :
  - Eau oxygénée,
  - Disque d'oxydase,
  - Colorants de Gram,
  - Huile à immersion,
  - Réactif de Kowacs,
  - VP I et VP II,
  - Rouge de méthyl,
  - Nitrate I et Nitrate II,
  - Ampoules de suspension Medium de 2 ml,
  - Ampoule de réactif ZYM. B,
  - Suspension d'une opacité égale à 0,5 Mac Farland.

- Matériel biologique : souches de référence :
  - *Listeria monocytogenes* référence : ATCC 19118
  - *Staphylococcus aureus* référence : ATCC 25923
  - *Rhodococcus equi* référence : ATCC 6939
  
- Verrerie :
  - Flacons en verre stériles de 500 ml,
  - Pipettes graduées stériles de 1, 2, 5 et 10 ml,
  - Pipettes Pasteur,
  - Lames et lamelles,
  - Tubes de 16 mm de diamètre stériles.

## Annexe : 2

### 2. Formules des milieux de culture

#### 1. Bouillon FRASER.

##### Composition :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone de protéase	5,0
Tryptone	5,0
Extrait de viande de bœuf	5,0
Extrait de levure	5,0
NaCl	20,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	12,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,35
Esculine	1,0
Chlorure de lithium	3,0

##### Principes :

- La forte teneur en chlorure de sodium permet d'accroître la sélectivité du milieu.
- Les phosphates agissent comme système tampon pour le maintien du pH.
- Le chlorure de lithium inhibe la plupart des Entérocoques susceptibles d'hydrolyser l'esculine.

##### Préparation :

Faire dissoudre les composants dans de l'eau, puis chauffer modérément jusqu'à dissolution complète. Ajuster le pH à 7,2.

Répartir ensuite le milieu à raison de :

- 225 ml par flacon qui serviront aux enrichissements primaires,
- 10 ml par tubes qui serviront aux enrichissements secondaires.

Stériliser ensuite le milieu à 121°C pendant 15 minutes.

##### Supplément sélectif pour Bouillon Fraser.

Au moment de l'utilisation du bouillon Fraser au demi tout comme le bouillon Fraser, ils doivent être additionnés de leur supplément dont la formule est la suivante :

Composants	Quantité
Acide nalidixique	22,5 mg
Acriflavine	28,125 mg
Citrate de Fer (III) ammoniacal	1,125 g

Reconstituer stérilement un flacon de supplément par 22,5 ml d'un mélange 1/1 eau/éthanol stérile (soit 11,25 ml d'eau distillée stérile et 11,25 ml d'éthanol ).

Mélanger doucement pour dissoudre.

Ajouter ensuite aseptiquement :

- 2,25 ml de la solution ainsi préparée, à 225 ml de bouillon Fraser au demi,
- 0,10 ml de la solution ainsi préparée, à 10 ml de bouillon Fraser.

Bien mélanger avant d'introduire l'inoculum.

Une fois reconstitué, le supplément doit être maintenu à +4°C, à l'abri de la lumière et ne doit pas dépasser les 8 jours.

Ce supplément est un mélange inhibiteur composé de 2 antimicrobiens et d'un réactif : le citrate de fer, dont les rôles sont les suivants :

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

En présence des ions ferriques, l'esculétine forme un complexe noir qui apparaît progressivement. La présence de fer favorise également la croissance des *Listeria*.

## 2. Gélose PALCAM

### Composition :

Constituants	Quantité en g/l
Peptone	23,0
Amidon	1,0
Agar - Agar	20,0
Chlorure de sodium	5,0
D(-) mannitol	10,0
Ammonium de fer III citrate	0,5
Esculine	0,8
Glucose	0,5
Chlorure de lithium	15,0
Rouge de Phénol	0,08

### Principes :

- La peptone favorise la croissance des Listeria.
- L'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.
- Le glucose et l'amidon représentent les sources énergétiques du développement.
- Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique.
- La fermentation du mannitol par les germes contaminants qui pourraient cultiver est mise en évidence par le virage au jaune du rouge de phénol, permettant ainsi d'orienter le diagnostic.

### Préparation :

Faire fondre le milieu puis le refroidir à une température de l'ordre de 48°C.  
Ajouter par la suite 2,25 ml du supplément Palcam reconstitué.

Homogénéiser et couler en boîtes de Pétri stériles.

Laisser solidifier sur paillasse puis les sécher à l'étuve.

Les boîtes ainsi préparées peuvent également être conservées à +4°C pendant 4 à 5 jours.

### Supplément sélectif pour gélose Palcam

Composants	Quantité
Sulfate de Polymyxine B	5,0 mg
Ceftazidime	10,0 mg
Acriflavine	2,5 mg

Il s'agit d'un mélange de deux antibiotiques (Polymyxine et Cefazidime ) et d'un colorant antiseptique ( l'acriflavine ).

- La Polymyxine B inhibe les Gram négatifs, y compris *Pseudomonas aeruginosa* , ainsi que quelques Gram positifs.
- La Cefazidime est un antibiotique à large spectre auquel *Listeria* est résistante.

### Mode d'emploi.

On reconstitue le supplément en y ajoutant aseptiquement 5 ml d'eau distillée stérile.

Mélanger doucement et soigneusement, puis répartir en boîtes de Pétri, qu'on laisse refroidir et sécher sur paille.

Les boîtes ainsi préparées peuvent être gardées à +4°C, pendant au plus 48 à 72 heures.

### 3. Gélose TSAYE

Composants	Quantité
Bouillon tryptone soja (1)	30,0 g
Extrait de levure	6,0 g
Agar Agar	9 à 18,0 g (2)
Eau	1000 ml
(1) Digestat enzymatique de caseïne	17,0 g
Digestat enzymatique de farine de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate dipotassique	2,5 g
Glucose	2,5 g
(2) selon le pouvoir gélifiant de l'Agar-Agar	

### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C, puis répartir dans des flacons ou dans des tubes, selon les préférences. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Les tubes seront refroidis en position inclinée. Les flacons seront refroidis en position debout ; au moment de leur utilisation, ils seront fondus, puis refroidis à environ 45°C, puis coulés en boîtes de Pétri.

#### 4. Gélose au sang de mouton.

Composants	Quantité
Digestat enzymatique de tissus animaux	15,0 g
Digestat enzymatique de foie	2,5 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar Agar	9 à 18,0 g
Eau	1000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C, puis répartir dans des flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Les flacons seront ensuite refroidis ; au moment de leur utilisation, ils seront fondus, puis refroidis à environ 45°C, puis on leur ajoute aseptiquement deux ampoules de sang de mouton défibriné. Mélanger soigneusement, puis répartir en boîtes de Pétri. Ce milieu est utilisé pour la mise en évidence de l'hémolyse.

#### 5. Gélose TSA

Composants	Quantité en g/l
Tryptone de caseïne	15
Farine de soja	5
Chlorure de sodium	5
Agar	20

#### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C, puis répartir dans des flacons. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Les flacons seront ensuite refroidis ; au moment de leur utilisation, ils seront fondus, puis refroidis à environ 45°C, puis on leur ajoute aseptiquement deux ampoules de sang de mouton défibriné. Mélanger soigneusement, puis répartir en boîtes de Pétri. Ce milieu est utilisé pour la mise en évidence de l'hémolyse dans le Camp-test.

## 6. Gélose Mobilité.

Composants	Quantité
Digestat enzymatique de caseïne	20,0 g
Digestat enzymatique de tissus animaux	6,1 g
Agar Agar	3 à 6 g
Eau	1000 ml

### Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition. Ajuster le pH à 7,3 à 25°C, puis répartir dans des tubes à raison de 5 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Il s'agit d'un milieu semi-solide qui favorise la mobilité des germes. Il doit donc être régénéré au bain-marie avant utilisation et l'ensemencement se fera alors par piqûre centrale.