

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI - CONSTANTINE
INSTITUT DE LA NUTRITION, DE L'ALIMENTATION ET DES TECHNOLOGIES AGRO ALIMENTAIRES
(INATAA)

N° d'ordre :
N° de série :

MEMOIRE DE STAGE

Présenté par

KAISMOUNE Nawel

En vue de l'obtention du diplôme de
POST-GRADUATION SPECIALISEE
Filière Sciences Alimentaires et Nutrition

Option Alimentation, Nutrition et Santé

Intitulé ***Gestion de la Qualité des Aliments
(GESQUAL)***

Titre du mémoire

***Listeria monocytogenes et les produits
alimentaires***

Date de soutenance : 12/05/2009

Devant le jury composé de :

Président **Dr. Nezel .N**
Encadreur **M. MEKHENCHA Djamel Eddine**
Examineur **Mm. Bakhouche .N**
 Dr. Khelifa foudil

Sommaire

Introduction et problématique	1
Partie Théorique	
Historique "le genre <i>listeria</i> "	4
CHAPITRE I Taxonomie et Physiologie	
I.1- Taxonomie	8
I.1.1- Caractéristiques morphologiques	8
I.1.2- Caractères biochimiques	9
I.1.3- Caractères cultureux	10
1 - Température et croissance	11
2 - pH et croissance	12
3 - Aw et croissance	12
4 - Sel et croissance	12
I.2- Physiologie de <i>Listeria monocytogenes</i>	13
I.3- Sérotypie et La lysotypie	14
I.3.1- Sérotypie	14
I.3.2 - La lysotypie	15
CHAPITRE II Listériose animale et Humaine	
II.1-La listériose animale	17
II.2- La listériose humaine	18
II.3- Les symptômes de la listériose	19
II.4- <i>Listeia monocytogenes</i> dans l'organisme et dans les cellules	19
II.5- Epidémiologie	20
II.6- Le traitement.....	22
CHAPITRE III <i>Listeria monocytogenes</i> et Les produits alimentaires	
III.1. Lait et Produits Laitiers	24
III.1.1- Les possibilités de croissance dans les fromages	28
III. 2 - Viandes et Produits carnes	28
III.2.1 - les produits carnes crus	28
III.2.2 - les produits carnés transformés	30
III.3 - Poissons et produits de la pêche	32
III.4 - Volailles et Ovo produits	34
III.4.1 – Volailles	34
III.4.2 - Oeufs Et Ovo produits	34
III.5 - Produits d'origine Végétale	35
III.5.1 - Les produits de IV ème gamme	36
III.6- Influence des modes de conditionnement sur la croissance de <i>listeria monocytogenes</i>	38
CHAPITRE IV Risque microbiologique lié à la <i>listeria monocytogenes</i> Dans les aliments prêts à consommer	
IV.1. Identification des dangers	41
IV.2. Les aliments et le risque de contamination par la <i>listeria monocytogenes</i>	44
IV.3. Classification des aliments selon le danger représenté par <i>listeria monocytogenes</i>	47
IV.3.1- Aliments à risque maîtrisé	47
IV.3.2- Aliments sûrs	47
IV.3.3- Aliments sensibles	48
IV.4. Exemple de maîtrise de risque d'apparition de <i>listeria monocytogenes</i> dans la transformation laitière fermière	51
IV.4.1. Préventions de la fourche à la fourchette	51
1. La production primaire	51
2. La transformation	52

**CHAPITRE V Méthodes de préservation des produits
agroalimentaires contre *listeria monocytogenes***

V.1- Microbiologie prévisionnelle	57
V.2 - Techniques de diagnostic	57
V.2.1- Identification bactériologique classique	58
A- Enrichissement	59
B- Isolement	59
C- Identification	59
V.2.2- Méthodes modernes	61
V.2.2.1- La méthode "Rapid'L.Mono"	61
V.2.2.2- La méthode de routine AFNOR NF V 08 055	64
V.2.2.3- La méthode normalisée FIL 143 (1990)	65
V.2.2.4- La méthode normalisée NF EN ISO 11290-1	65
V.2.2.5- La méthode normalisée NF EN ISO 11290-2	65
V.2.2.6- La méthode VIDAS® LDUO	65
V.2.3- Tests d'identification rapide	66
CHAPITRE VI Prophylaxie	
VI.1- Prophylaxie dans les élevages	68
VI.2- Prophylaxie dans les industries	69
VI.3- Prophylaxie chez l'homme	70
VI.4- Développement de <i>listeria monocytogenes</i> dans les aliments	71
VI.5- Législation	72
Partie pratique	
I. Cas de listériose dans le monde	74
II. Présence de la listéria en Algérie	74
III. Les coûts et tarifs des méthodes rapides pour la recherche et identification de la <i>listeria monocytogenes</i>	77
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	
	81

Liste des Abréviations

AFNOR	: Association Française de Normalisation
AFSSA	: Agence Française pour la Sécurité Sanitaire des Aliments
AW	: Activité d'eau
CSHPF	: Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention (USA)
CCFH	: Comité du Codex sur l'Hygiène Alimentaire
DLC	: Date Limite de Consommation
FAO	: Food and agriculture organization
HACCP	: Hazard Analysis Critical Control Point
ISO	: International for Standardisation Organisation
<i>L.m</i>	: <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L</i>	: <i>Listeria</i>
OMS	: Organisation Mondiale de la Santé
RM	: Rouge de Méthyle
UFC	: Unité Formant Colonie
VP	: Vogues Proskauer

Introduction et problématique

La sécurité microbiologique des aliments est devenue l'une, sinon la première, préoccupation des consommateurs, notamment dans les pays dits industrialisés.

Pour assurer cette sécurité, les aliments sont produits dans des conditions qui doivent permettre la maîtrise de l'hygiène par les opérateurs économiques. La mise en place de procédures de type HACCP (Analyse des Dangers et Points Critiques pour leur Maîtrise) est un outil fondamental de cette maîtrise.

L'incidence croissante des maladies provoquées par les microorganismes transmis principalement par les aliments tels que *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejunii* a été signalée dans de nombreux pays, au cours de ces dernières décennies.

La *Listeria monocytogenes* est recherchée dans le cadre des analyses obligatoires pour l'autocontrôle car elle peut être à l'origine d'intoxications alimentaires graves. Les cas sporadiques et les épidémies sont associés à une large gamme de produits peu ou très élaborés. Les produits transformés prêts à consommer parmi lesquels se retrouvent les fromages au lait cru sont particulièrement concernés. La listériose, infection grave d'origine alimentaire liée à la consommation d'aliments contaminés, représente un réel risque sanitaire étant donné le taux élevé de mortalité ($\pm 30\%$) des personnes infectées.

La réglementation concernant *Listeria* est encore réduite même si la tendance est de rechercher d'avantage ce genre. En effet, le genre *Listeria* est nettement moins cité que le genre *Salmonella* qui fait référence dans le quasi totalité des produits alimentaires.

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

- La gravité de ce germe qui est un agent causal de **listériose** est une maladie mortelle ;
- Cette bactérie est douée d'une ubiquité remarquable, d'où sa présence à l'état saprophyte dans le sol, les litières, les eaux usées, les ensilages, les ateliers de fabrication, les produits carnés, les plats cuisinés les végétaux... ;
- Nous sommes quotidiennement exposés au risque d'héberger *L. monocytogenes* par ingestion d'aliments contaminés ;

- La prise en charge thérapeutique et préventive d'une toxi-infection nécessite la mobilisation de moyens humains, matériels et financiers importants.
- Malheureusement les analyses concernant la recherche et l'identification de *L. monocytogenes* enregistre certaines insuffisances notamment en ce qui concerne les systèmes d'autocontrôle dans les ateliers et usines de l'industrie alimentaire (HACCP), la prise de conscience collective, l'information du consommateur et l'hygiène alimentaire.

A cet effet, et pour mieux cerner la problématique exposée dans ce travail nous avons scindé ce dernier en deux parties principales qu'on peut résumer comme suite :

1- Partie Théorique : La partie théorique comporte six chapitres :

Chapitre I : Taxonomie et Physiologie :

Chapitre II : Listériose Humaine :

Chapitre III : *Listeria monocytogenes* et Les produits alimentaires :

Chapitre IV : Risque microbiologique lié à la *listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer :

Chapitre V : Méthodes de préservation des produits

Agroalimentaires contre *listeria monocytogenes* :

Chapitre VI : Prophylaxie :

2- Partie Pratique : en ce qui concerne la partie pratique nous avons pris des résultats d'études réalisés par le CACQE (cas de listériose dans le monde et présence de la listéria en Algérie) et nous avons mis en évidence les coûts et tarifs des méthodes rapides pour la recherche et identification de la *listeria monocytogenes*

Quelques définitions

- **La microbiologie des aliments** : est une science relativement récente, dont l'une des conséquences fut d'établir, pour les denrées, des limites acceptables évitant tout risque potentiel pour le consommateur. [10]
- **Sécurité alimentaire** : Garantie que la consommation d'un produit alimentaire ne risque pas d'avoir de conséquence néfaste sur la santé des consommateurs. L'entreprise a une obligation de résultats et doit avoir mis en place les méthodes nécessaires pour la garantir jusqu'à la consommation finale. [4]
- La sécurité alimentaire est aussi entendue dans les pays développés comme les précautions à prendre pour garantir aux consommateurs que les produits alimentaires vendus sont dépourvus de problèmes sanitaires et de maladies.[3]
- **Quelle est la cause de la listériose ?**

C'est la *Listeria monocytogenes*, une bactérie qui se trouve partout dans l'environnement (dans le sol, dans l'eau et sur les plantes). Les animaux et l'Homme peuvent être porteurs de la bactérie sans être malade et contaminer ainsi des produits d'origine animale (viande, lait, ...). La plupart des infections chez l'homme proviennent cependant des aliments. [11]

- **Prophylaxie**

La prophylaxie des infections à *Listeria* (listériose humaine): est une prophylaxie sanitaire qui nécessite un contrôle de tous les échelons de la filière agro-alimentaire. La prophylaxie médicale: vaccination et/ou antibioprophyllaxie.

Partie

Théorique

Historique "le genre *listeria* "

Historique

Le nom *Listeria* lui a été donné par PIRIE en 1940 en l'honneur du chirurgien LISTER. [9]

Elle est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes d'où son nom de monocyto-gènes. [1]

Hulphers, vétérinaire Suédois, fut le premier auteur à avoir décrit cette infection chez un lapin atteint de méningite en 1911. [9]

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*. [2]

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. [1]

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

- Prie, 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 *Bactérium 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 boeuf cuit, une seule souche de *Listeria* qui se différencie de *Listeria monocytogenes* par la réduction des nitrates et l'ont décrites 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. [1]

- 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.

Par ailleurs, ce n'est qu'en 1960 que les infections humaines à *Listeria* ont été diagnostiquées, et qu'en 1981 qu'on a observé les premières flambées de Listériose et démontré que la bactérie responsable de la maladie pouvait être transmise par certains aliments, en plus des modes habituels de transmission. Le CDC estime à

1850 cas d'infection causés annuellement aux USA, dont 425 cas mortels soit 23 %.

[1]

Depuis, on a enregistré dans le monde :

Les aliments pour animaux (ensilages par exemple) sont souvent à l'origine de la contamination. La première mise en cause du lait dans une épidémie en Allemagne date de 1950. [9]

- En 1982 , au Canada 41 cas dont 17 morts parmi lesquels 83 % étaient des cas périnataux, ayant pour origine une salade de choux conservée à +4°C et vendue dans un supermarché ; les choux provenaient d'un champ fertilisé avec des crôtons de moutons contaminés.

- En 1983 à Boston, 49 personnes dont 14 morts parmi lesquels 14 % étaient des cas périnataux, ayant pour origine un lait pasteurisé sans aucune confirmation.

- Entre 1983 et 1987 en Suisse, 122 cas, dont 34 morts, ayant pour origine, un fromage à pâte molle (Vacherin Mont-d'or) contaminé par *Listeria monocytogenes*.

- En 1984/85, en Californie du Sud, 142 cas dont 48 morts parmi lesquels 85 % étaient des cas périnataux, ayant pour origine des fromages frais de type **Mexicain**, fabriqués aux USA à partir de lait américain provenant d'un troupeau infecté.

- En 1987 à Philadelphie, 32 cas dont 11 morts. La cause ne fut jamais identifiée. [1]

Et En 1987, en Suisse, 122 cas et une vingtaine de décès ont pu être attribués à ce germe présent dans un fromage (vacherin). En 1989, 300 cas sont décrits en Grande-Bretagne (pâté) tandis qu'en France plusieurs centaines de cas ont été signalés à partir de 1986 (plus de 650 en 1987). [9]

- En 1988 aux Massachusetts, 56 cas et une quarantaine de cas en 1983 ayant pour origine probable un lait pasteurisé. [1]

- En 1992, en France, 279 cas de listériose dont 63 décès ayant pour origine la langue de porc en gelée. C'est *Listeria monocytogenes* sérotype 4b qui est identifiée ; ce sont de mauvaises règles d'hygiène en cours de fabrication qui seraient à l'origine de cette épidémie. [9]

- En 1993, 25 cas ont encore été recensés en France suite à la contamination par des rillettes. [6]

- En 1995, en France, 20 cas dont 4 décès, ayant pour origine un fromage appelé "Le Brie de Meaux".

- En 1997, en France, 15 cas dont 2 morts, lors d'un avortement et un enfant mort à la naissance, ayant pour origine des fromages à pâte molle.

- En 1998, aux Etats-Unis d'Amérique, 100 cas d'infection dont 20 mortels comprenant 2 avortements, ont été recensés dans 11 Etats (notamment en Ohio, à New York, au Tennessee, au Massachusetts, en Virginie-Occidentale, au Michigan, au Connecticut, en Oregon, Vermont et en Georgie). Des saucisses de type hot-dog étaient la source de l'infection. Le 22 décembre, le fabricant, Bil Mar Foods, a volontairement rappelé des lots de production particuliers de saucisses (15 millions de livres) et d'autres produits de viande pouvant être contaminés.

-En février 2000, une épidémie déclenche de nombreuses réactions des médias et des autorités compétentes (INVS, AFSSA). [9]

- En 2000 et le 06 Mai le Président Clinton, a prononcé devant le congrès américain à la maison blanche (Washington), un discours relatif à la stratégie globale de prévention et de lutte contre *Listeria monocytogenes* particulièrement dans les hot dogs et ce suite au rapport du CDC.

En Algérie, ont été 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.

- Ramdani N (1999), 5 cas humains.

- Naim M (Hôpital Central de l'Armée – 2000), 1 cas humain.

- 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.

- Lebres E & Guetarni D (2004) : 28 souches de *Listeria* dont 10 *Listeria monocytogenes* et 17 *Listeria innocua* et 1 *Listeria ivanovii* à partir de 1432 échantillons de laits crus. [1]

CHAPITRE I

Taxonomie et Physiologie

I.1- Taxonomie

I.2- Physiologie de *Listeria monocytogenes*

I.3- Sérotypie et La lysotypie

I.1- Taxonomie

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* .[1]

Listeria monocytogenes, espèce type du genre *Listeria*, a été décrite en 1926 par Murray *et al.* sous le nom de "*Bacterium monocytogenes*" puis renommée "*Listerella hepatolytica*" (Pirie, 1927). En 1940, Pirie a proposé la nomenclature de *Listeria monocytogenes* qui sera retenue par les *Approved Lists of Bacterial Names*. [8]

En 1961, Prévot propose l'appellation de *Listeria denitrificans* pour une unique souche bactérienne isolée en 1948 par Sohler, Benazet et Piéchaud à partir de sang de bœuf chauffé. Ultérieurement, ont été décrites les espèces *Listeria grayi* et *Listeria murrayi*. Ces quatre espèces ont été retenues dans les *Approved Lists of Bacterial Names* mais, depuis la parution de ces listes, la systématique du genre *Listeria* a été profondément modifiée. [1]

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

En 1992, Rocourt *et al.* confirment l'existence de fortes similitudes génomiques entre *Listeria grayi* et *Listeria murrayi* et proposent de réunir ces deux taxons en une unique espèce qui, en raison des règles de priorité, doit être dénommée *Listeria grayi*. [7]

I .1.1- Caractéristiques morphologiques

Les *Listeria* sp. se présentent sous la forme de petits bacilles droits, de 0,4 à 0,5 µm de diamètre sur 0,5 à 2,5 µm de longueur, aux extrémités arrondies, se présentant de manière isolée ou groupés en V ou en L ou en palissades ou, parfois, en courtes chaînes ou petits amas. Ce sont des bactéries à Gram positif, non acido-résistantes, non capsulées, non sporulées, aéro-anaérobies facultatives mais cultivant mieux en aérobiose et mobiles lorsqu'elles sont cultivées à 20 °C (ciliature périt riche), immobile 37° C, non capsulé, non sporulé. [7, 11,12]



Photo n° 1: Aspect de *Listeria monocytogenes* au Gram. [1]

I.1.2- Caractères biochimiques

Tableau n°1. Les caractéristiques biochimiques et culturelles du genre *Listeria*

Caractéristiques	Réaction
Catalase	+
Besoin en oxygène	Facultatif
Croissance en 35°C	+
Mobilité à 37°C	+
Mobilité à 22°C	-
Rouge de méthyle	+
Voges proskauer	+
Production de H₂S	-
glucose (acidification)	+
Indole	-
Citrate	-
Uréase	-
Mannitol	-
Nitrate réduit en nitrite	-
Gélatine	-

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



Photo n° 2 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose mobilité à 22 ° C. [1]

Biotype de *L. monocytogenes*

Glucose + (gaz -), esculine + (gaz -), maltose + (gaz -), rhamnose + (gaz -), xylose - , fructose +, mannose +, cellobiose +, tréhalose +, gentobiose +, mannitol -, D arabitol +, esculine+, amygdaline +, salicine +, uréase -, indole -, H₂S -, RM +, VP +, nitrate réductase -, hémolyse β +. [9]

I.1.3- Caractères culturels

Les *Listeria* sp. ne sont pas des germes exigeants et la culture est obtenue sur les milieux classiques telles qu'une gélose nutritive ou une gélose au sang. La culture est stimulée par l'addition de glucose à la concentration de 0,2 à 1 % et, sur de tels milieux, les cultures dégagent une odeur de beurre rance.

Sur gélose nutritive, après 24 heures d'incubation en aérobie à 30-37°C, les colonies sont lisses, légèrement convexes, à bords réguliers, translucides et leur diamètre varie de 0.5 à 1.5 mm. En transillumination oblique, les colonies présentent une coloration bleu-vert caractéristique. Si l'incubation est prolongée, les colonies grandissent, s'opacifient, elles peuvent prendre un aspect rugueux et celles de l'espèce *Listeria grayi* apparaissent orange rouge en transillumination oblique. Sur gélose nutritive contenant du glucose et incubée à 22-25°C, quelques souches de *Listeria grayi* produisent un pigment jaune.

Sur une gélose contenant 5% de sang de mouton ou de cheval ou de lapin ou d'homme, les colonies de *Listeria ivanovii*, de *Listeria monocytogenes* et de *Listeria*

seeligeri sont bêtas hémolytiques. Le sang de certaines espèces, notamment celui des ovins, peut contenir des anticorps anti-*Listeria* et il est préférable de rechercher l'hémolyse en utilisant des globules rouges lavés. L'hémolyse est particulièrement importante avec *Listeria ivanovii* (le rayon de la zone d'hémolyse peut atteindre 1 cm après 3 jours d'incubation) et les souches de cette espèce peuvent s'entourer de plusieurs zones d'hémolyse. En revanche, l'hémolyse est moins importante pour *Listeria monocytogenes* ou *Listeria seeligeri* et elle n'est parfois visible que sous la colonie.

1 - Température et croissance

En laboratoire *Listeria* se développe de + 3 à 45° C mais certaines espèces peuvent se développer au environ de 1° C. Mais *Listeria innocua*, *Listeria murrayi* et *Listeria grayi* ne se développent plus respectivement, en dessous 1.7°C, -2.8°C, et 3° C.

D'autres études ont montré que *Listeria monocytogenes* est capable de se développer jusqu'à -4° C avec un temps de génération de 131h. [15]

Tableau 2 : Temps de génération de *Listeria monocytogenes* (d'après Ryse et Marth 1991)

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

2 - pH et croissance

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

La croissance de *Listeria monocytogenes* à des pH bas est directement liée à la température (tableau 3). [15]

Tableau 3: Croissance de *Listeria monocytogenes* sur Trypticase Soy Broth (Iarpen)

T°C d'incubation	pH minimal de croissance
30	4,39 - 4,63
20	4,39 - 4,62
10	4,62 - 5,05
7	4,62 - 5,05
4	5,23 - 5,45

3 - Aw et croissance

L'Aw optimum de *Listeria* est de 0,97 mais cette bactérie peut se développer jusqu'à 0,943. *Listeria* survit 132 jours à 4°C à un Aw de 0,83 sur trypticase, soja. Un Aw faible (environ 0,90) augmente la résistance de *Listeria monocytogenes* à la chaleur, et peut survivre sur des emballages pendant 14 jours de -0,8°C à 6,6°C. [15]

4 - Sel et croissance

Listeria est capable de se développer en présence de 10% NaCl (Bergey's Manual). Mais d'autres souches peuvent se développer avec 12% de NaCl.

Listeria monocytogenes survit 150 jours dans du NaCl pur et 545 jours dans 0,85 de NaCl, et le temps de survie dans 25% de NaCl augmente quand la température baisse (24 jours à 22°C, 132 jours à 4°C). [15]

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



Photo n°3 : Aspect de *Listeria monocytogenes* sur gélose au sang. [1]

I.2- Physiologie de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative. La porte d'entrée est digestive (aliments contaminés). A partir de l'intestin, les bactéries gagnent les ganglions lymphatiques régionaux, puis la circulation sanguine. Les monocytes véhiculent et libèrent les bactéries dans la circulation. Les bactéries se multiplient dans le foie et la rate qui est les organes cibles. La plupart du temps, le système immunitaire contrôle l'infection chez les sujets immunocompétents qui font une infection inapparente

Cependant, si l'inoculum a été massif ou chez certains sujets fragilisés, l'infection n'est pas contrôlée dans l'intestin, la rate et le foie et les bactéries sont libérées dans la circulation sanguine, exposant le placenta et le système nerveux central. Chez la femme enceinte, surtout après le 5ème mois, les bactéries colonisent le placenta avec formation de nombreux granulomes inflammatoires, puis induisent à une chorio-

amniotite et l'infection de l'enfant in utero (90% des cas). Plus rarement, l'enfant peut être contaminé à la naissance (< 10% des cas).

I.3- Sérotypie et La lysotypie

I.3.1- Sérotypie

Le sérotypage des *Listeria* s'effectue à partir de 15 antigènes somatiques (de I à XV) et de 5 antigènes flagellaires (A à E). La combinaison de ces types d'antigènes permet d'identifier 17 sérovars. 3 de ces sérovars (1/2a, 1/2b, et 4b) représentent 95% des souches isolées et sont responsables des listérioses humaines. Le sérovar 4b de *L.m* est à l'origine de la plupart des listérioses humaines dans le monde, et est rarement isolé des aliments. [15]

Les souches de *Lm* de sérovars 4b étaient prépondérantes, représentant 42 % du total des cas, quelle que soit la forme clinique. La prédominance de ce sérovars est observée depuis 1987. [16]

Tableau 4: Distribution annuelle en pourcentage des principaux sérovars à l'origine des cas sporadiques de listériose diagnostiqués de 1987 à 2001

Année	1/2a	1/2b	1/2c	4b	Autre sérovars	Année	1/2a	1/2b	1/2c	4b	Autre sérovars
1987	21	13	1	64	1	1995			3		
1988	39	15	1	44	1	1996	44	19	3	32	2
1989	20	12	2	64	2	1997	31	19	3	46	1
1990	26	20	2	49	3	1998	31	17	5	47	2
1991	29	23	1	46	1	1999	28	16	5	47	4
1992	42	21	2	32	3	2000	26	20	4	48	1
1993	38	22	1	38	1	2001	33	15	3	48	0
1994	43	15	2	39	1		33	21		42	1

Source : centre national français de référence des *Listeria*

I.3.2 - La lysotypie

La lysotypie permet de répertorier une bactérie par sa sensibilité à divers phages. Actuellement 213 phages sont répertoriés mais seuls 55 sont spécifiques du genre *Listeria* : ils lysent toutes les espèces du genre.

L.m est lysotypable à environ 70% pour le sérotype 4 et à 50% pour le séro groupe 1/2 et 3. Le nombre de souches lysotypables varie aussi avec le pays (91% en Nouvelle Zélande et 57% pour la France). L'analyse en spectrométrie de masse avec pyrolyse aussi efficace que la lysotypie permet de définir 25 lysotypes pour le séro groupe 1/2 et 119 pour le séro groupe 4b de *Listeria monocytogenes*.

La sérotypie et la lysotypie sont des méthodes permettant de suivre précisément une épidémie (origines des foyers épidémiques) mais des méthodes moléculaires sont utilisées pour combler des lacunes de la lysotypie.[15]

CHAPITRE II

Listériose Animale et Humaine

II.1-La listériose animale

II.2- La listériose humaine

II.3- Les symptômes de la listériose

II.4- *Listeria monocytogenes* dans l'organisme et dans les cellules

II.5- Épidémiologie

II.6- le traitement

II.1-La listériose animale

Maladie très répandue dans les zones tempérées, à manifestation sporadique, parfois pseudo-enzootique (lors de consommation d'une fin de silo contaminée).

Tout facteur à l'origine d'une immunodépression favorise l'expression clinique de la listériose: gestation, stress, froid, carences... L'incidence augmente de décembre à mai.

L'utilisation d'ensilage de mauvaise qualité, surtout conservé en silo taupinière est un facteur déterminant. On note l'importance de l'utilisation d'ensilage: 22% des ovins consommant de l'ensilage sont touchés contre 8% avec l'herbe. L'infection est parfois proche de 100% dans un élevage mais la clinique reste sporadique.

Matières virulentes Lait, fèces, urines, avorton et plus ou moins les sécrétions nasales sont virulents. [19]

Les mammifères font une maladie proche de la forme humaine, avec méningoencéphalites. Les ruminants présentent des encéphalites sans méningite (mouton, chèvre, bétail), des mammites chroniques parfois asymptomatiques qui sont à l'origine de contamination du lait et des formes génitales avec avortement. [18]

Réceptivité

- les ovins sont plus sensibles que les caprins
- l'âge moyen des malades est de deux ans
- les jeunes déclarent plus souvent des formes septicémiques
- les femelles gestantes sont principalement sensibles pendant le dernier tiers de gestation.

Sources

- la principale source est l'origine tellurique
- animaux malades
- animaux porteurs surtout : l'excrétion se fait via les selles et le lait suite à un stress. On peut observer une excrétion asymptomatique pendant plus de 3 ans.

- Rôle des oiseaux sauvages [19]

II.2- La listériose humaine

La listériose humaine est une maladie infectieuse liée à la consommation d'aliments ; sa durée d'incubation peut être longue (3 à 70 jours) ; elle peut se manifester sous plusieurs formes :

- aiguë avec une atteinte du système nerveux central et des méninges (la plus fréquente). Une méningite purulente et une méningo-encéphalite, une septicémie avec broncho pneumonie, une conjonctivite, une rhinite, une sinusite, une pyélite, et des atteintes pleuro pulmonaires traduisent le pouvoir pathogène de la bactérie. Chez l'homme les atteintes sont souvent mal individualisées

- **Chronique** avec des atteintes localisées
- **légère** et inapparente chez la femme enceinte. L'infection atteindrait de préférence la femme chez laquelle elle est considérée comme une infection latente des organes génitaux.

L'infection du **nouveau-né** contaminé par voie placentaire est fréquente et apparaît dans les jours qui suivent la naissance succédant à un syndrome grippal de la mère ; le germe peut être isolé dans les urines et les sécrétions génitales de la mère. L'infection est très grave, en particulier chez les prématurés. Elle se manifeste par des signes cutanés et respiratoires, des troubles neurologiques avec liquide céphalorachidien puriforme et présence du germe dans les éléments éruptifs et les urines. [9]

Les infections à *Listeria monocytogenes* sont connues depuis 1920 et elles s'observent, essentiellement (mais pas uniquement) chez les femmes enceintes (quel que soit le terme de la grossesse), les nouveau-nés contaminés par leurs mères et les individus présentant des troubles du système immunitaire dus à diverses causes. Ces derniers sont classés, par le Centre National de Référence des *Listeria*, en trois groupes avec un niveau de risque décroissant:

- 1) personnes atteintes d'hémopathies, transplantées, atteintes de SIDA ;
- 2) personnes atteintes de cancers solides, d'hépatopathies et les hémodialysés ;
- 3) personnes diabétiques mal équilibrées et les alcooliques.

Classiquement, les personnes âgées sont considérées comme faisant partie des sujets à risque et certains chiffres publiés dans la littérature scientifique font état d'une incidence des listérioses 11 fois plus élevée à partir de 70 ans qu'entre 20 et 40 ans.

La contamination des adultes se fait le plus souvent par voie digestive et elle résulte soit de l'ingestion d'aliments contaminés soit d'une infection endogène liée à un portage intestinal. Dans ce dernier cas, des altérations de la muqueuse intestinale (liées par exemple à des infections gastro-intestinales) ou des altérations du système immunitaire local (immunothérapie, immunodépression) permettraient une invasion de la barrière intestinale. La réalité des infections endogènes est suggérée par les cas de listériose observés en 1987 à Philadelphie (36 cas de listériose dont 16 mortels). Ces cas étaient dus à de nombreuses souches ce qui excluait le rôle d'une unique source de contamination et, dans la plupart des cas, ils ont été observés chez des patients atteints de troubles gastro-intestinaux et présentant une érosion de la muqueuse intestinale.

Des infections nosocomiales ont également été décrites (transmission par des incubateurs, des couveuses ou des thermomètres) mais elles sont rares et témoignent d'un non-respect des règles d'hygiène. [8,20]

II.3- Les symptômes de la listériose

Se traduisent par une fièvre, une céphalée, des nausées, des vomissements, une pharyngite, des douleurs musculaires, une monocytose, une méningite, des lésions externes, une septicémie, des avortements. Souvent les symptômes ressemblent à ceux de la grippe.

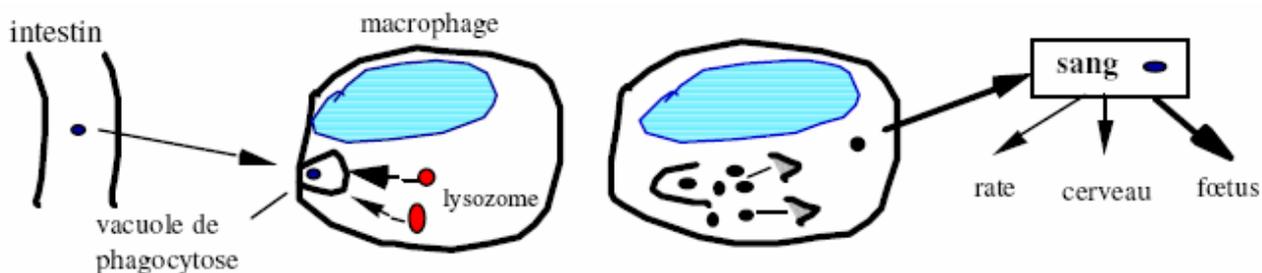
II.4- *L.monocytogenes* dans l'organisme et dans les cellules

La porte d'entrée de l'infection, chez l'homme, est le plus souvent le tube digestif à la suite de l'absorption d'aliments contaminés. D'autres portes d'entrée ont été suspectées mais non démontrées, en particulier les voies respiratoires supérieures (angine, pharyngite, infection pseudo grippale).

Les *Listeria* traversent la membrane intestinale et sont pour la plupart phagocytées par des macrophages. Cette entrée dans le macrophage est liée à la présence de deux facteurs : les internalines InIA et InIB. Les lysosomes se déversent alors dans la vacuole de phagocytose. La multiplication bactérienne s'arrête mais les *Listeria* vivantes produisent une listériolysine O (en une trentaine de minutes), protéine de 529 acides aminés, qui détruit la membrane du phagosome. Les *Listeria* entrent alors au contact du cytoplasme du macrophage et se multiplient à nouveau, le macrophage

étant détruit par ses propres lysosomes. Les *Listeria* se retrouvent dans le sang puis le foie, la rate et même le cerveau.

Schéma n°1: le chemin de *listeria monocytogenes* dans l'organisme humain [9]



Simultanément à cette phase la bactérie synthétise des filaments d'actine qui forment une structure en « comète », ce qui engendre une force motrice nécessaire au mouvement de la bactérie (gène ActA). Les *Listeria* progressent dans le cytoplasme à 0,3mm/s et au contact de la membrane cellulaire induit une invagination qui conduit à la pénétration dans une nouvelle cellule hôte avec une vésicule entourée de deux membranes plasmiques. Ces membranes sont lysées par une lécithinase (gènes PicB et mpl). Cette transmission de cellule à cellule permet à la bactérie de contourner les défenses de l'hôte (anticorps circulants, complément). La plupart des gènes impliqués dans la virulence sont situés sur un îlot de pathogénicité du chromosome (15 kb).

L'organisme réagit alors en activant ses macrophages et un nombre plus élevé de lysosomes se déverse dans la vacuole et les *Listeria* meurent. Chez les immunodéprimés ou chez le fœtus et certains malades cette réaction n'intervient pas, les *Listeria* se développent et causent des encéphalites. [2,9]

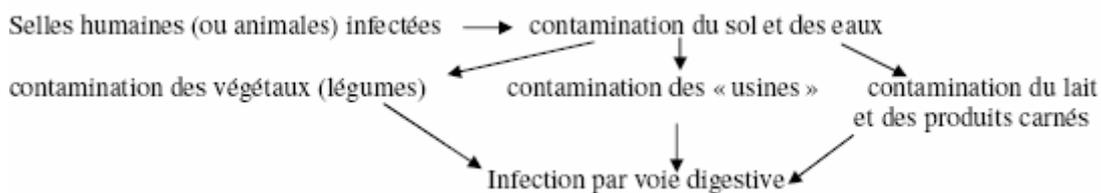
II.5- Épidémiologie

La listériose humaine est essentiellement diagnostiquée dans les pays industrialisés. Il s'agit d'une maladie infectieuse d'origine alimentaire, *L. monocytogenes* s'implantant progressivement dans nos usines en raison de son aptitude à coloniser des zones humides (matériels, locaux, environnement) et surtout par sa capacité à se multiplier à basse température. Les aliments responsables sont soit contaminés à la production soit en cours de distribution (contaminations croisées). Depuis 1987, l'enquête réalisée par les Services Vétérinaires, la DDAS, l'Institut National de Veille Sanitaire etc. en cas d'épidémie permet en général l'identification relativement rapide de l'aliment responsable ; les mesures préventives sont prises en

conséquence (divulgaration de marque, retrait, information, etc.). Le plus souvent il s'agit d'aliments fortement contaminés (plus de 100 bactéries / g) consommés en l'état et dont la composition permet la croissance de *Listeria* ; ces aliments sont généralement conservés au froid (réfrigération). La dose infectante est estimée à plus de 100 cellules viables et l'incubation varie entre 2 jours et plus de 6 semaines. Il existe de nombreux porteurs sains de *Listeria monocytogenes*. [1,9]

L'épidémiologie est mal connue ; les animaux sont des réservoirs naturels de la bactérie qui se propage soit par contamination directe, soit par contamination indirecte par l'intermédiaire du sol, des eaux usées ou des aliments souillés par les selles ou les urines d'animaux infectés ou d'arthropodes vecteurs. Le contact avec des produits ou objets ou surface contaminés peut se traduire par une dissémination de la bactérie et une rémanence dans une usine ou un type donné de produit. Il existe chez les animaux beaucoup de porteurs sains. L'homme peut se contaminer au contact d'animaux malades.

Le schéma n°2 : possibilité d'infection listérienne chez l'homme



La bactérie reste viable après plusieurs années d'entreposage à 4° C.

Les « bio films » présents dans les usines (murs, haloirs, etc) permettent des compétitions de flore et donc la régulation de certains pathogènes. L'élimination des germes fragiles (entreposage dans des conditions drastiques comme le froid, les milieux salés, certains agents antimicrobiens, etc.,) laissent les *Listeria* particulièrement résistantes seules ; la contamination liée à leur développement devient alors plus fréquente.

La contamination directe par contact avec des animaux ou des hommes malades est rare. Ce n'est qu'en 1985 que la relation entre la listériose et la consommation de fromage a été indiscutablement établie. La relation plante-sol, comme pour la plupart des autres germes de la famille des *Lactobacillaceae* permet la constitution d'un réservoir (source primaire). Le germe se rencontre dans les produits laitiers non pasteurisés ou recontaminés. Le changement des habitudes alimentaires avec

augmentation de la consommation de produits végétaux crus, réfrigérés est aussi à l'origine de l'augmentation du nombre de cas de listérioses. [1,9]

Le nombre de cas chez les adultes est compris entre 2 à 20 par million d'habitants et atteint 200 cas « périnataux » par million. Aux USA le nombre de décès estimé est au moins de 450 en 1986 pour 1700 cas au moins. La mortalité est voisine de 20 % pour des adultes âgés de moins de 60 ans et de plus de 40 % pour des personnes âgées de plus de 60 ans. Plus de 80 % des cas affectent des personnes de plus de 50 ans. [22]

II.6- le traitement

L. monocytogenes est une bactérie très sensible aux antibiotiques. À de rares exceptions près, la sensibilité est presque constante aux pénicillines (pénicilline G, ampicilline), aux aminosides (gentamicine), aux tétracyclines (sauf de rares souches résistantes) et au triméthoprim-sulfaméthoxazole. Le niveau de résistance *in vitro* est intermédiaire à celui des céphalosporines de troisième génération et de la fosfomycine, lesquelles sont contre-indiquées en cas de listériose. Toutes les souches sont résistantes à l'acide nalidixique et à la colistine, mais sensibles à la rifampicine et aux nouvelles quinolones (péfloxacin), dont les concentrations minimales inhibitrices restent médiocres (de 2 à 8 mg/l). Les souches sont sensibles à la vancomycine qui est peu ou non efficace sur les localisations neuro-méningée ; Le traitement de choix d'une listériose neuro-méningée est fondé sur l'association ampicilline aminoside. Chez l'adulte, l'ampicilline est administrée par voie veineuse à la dose de 200 mg/kg/j. Chez le nouveau-né et l'enfant, la dose est portée à 400 mg/kg/j pendant les premiers jours de l'infection. La pénicilline G à la dose de 300 000 UI/kg/j peut remplacer l'ampicilline chez l'adulte. La gentamicine, associée à l'ampicilline, est administrée par voie musculaire ou veineuse à fortes doses (de 3 à 6 mg/kg/j). La durée du traitement est de 3 ou 4 semaines du fait de la possibilité de rechutes en cas de traitement trop court, surtout chez les sujets immunodéprimés.

En cas d'allergie aux pénicillines, le triméthoprim-sulfaméthoxazole, associé à la gentamicine, donne de bons résultats. D'autres antibiotiques (chloramphénicol, rifampicine ou tétracyclines), associés à un aminoside, ont aussi été utilisés avec succès. Si une listériose est suspectée et diagnostiquée par les hémocultures chez la femme enceinte, le traitement repose sur l'ampicilline (6 g/j) par voie veineuse pendant 3 semaines. [8,23]

CHAPITRE III

Listeria monocytogenes et Les produits alimentaires

III.1. Lait et Produits Laitiers

III. 2 - Viandes et Produits carnes

III.3 - Poissons et produits de la pêche

III.4 - Volailles et Ovo produits

III.5 - Produits d'origine Végétale

III.6- Influence des modes de conditionnement sur la croissance de *listeria monocytogenes*

Les sources primaires de la bactérie sont les tissus, urine ou lait des animaux malades. Cette maladie mondiale est « rare ». Les produits incriminés sont essentiellement le lait, les produits laitiers, les oeufs, les viandes et dérivés, les volailles et les légumes consommés crus.

La plupart des **animaux** domestiques ou sauvages sont porteurs de la bactérie (fèces de bovins, ovins, porcins, volailles, renards, lapins, oiseaux, poissons, crustacés, insectes, etc.). Ces animaux porteurs sains disséminent la bactérie dans leur environnement. En élevage plus de 80 % du cheptel peut être porteur.

Les pâturages sont ainsi contaminés par les déjections ou les épandages ou des fourrages.

La bactérie peut aussi survivre de longues années dans le **sol**.

Les **ensilages** sont souvent contaminés, et ce d'autant plus que le pH est élevé : pour des pH > 5,0 plus de 60 % des fourrages sont porteurs de *Listeria*, tandis que ce pourcentage est de 40 % à pH 4, 5 et n'est que de 20 % pour des pH inférieurs à 4. Si le pH remonte par protéolyse microbienne la bactérie se multiplie intensément. Les températures hivernales n'inhibent pas la prolifération du germe. L'ammonisation des pailles et foin amène le pH à 8,5 – 9,0 ce qui n'inhibe pas le développement de la bactérie.

Les ensilages de qualité médiocre renferment 10⁴ *Listeria* par gramme. Un mouton qui consomme 1,5 kg d'ensilage par jour ingère donc 1,5.10⁷ germes. Une vache qui consomme 20 kg d'ensilages ingère environ 10⁸ *Listeria* par jour.

Plus de 50 % des fèces des animaux contiennent la bactérie et sont à l'origine de la contamination de la viande et du lait.

Deux épidémies de listériose ont été attribuées à la consommation de **salade** et **choux** dont le niveau de contamination était inférieur à 100 / g.

La présence de cette bactérie a été détectée essentiellement dans du **lait** ou dans des **produits laitiers** non ou mal pasteurisés (elle survit à la pasteurisation dans certaines conditions de milieu), dans des **produits carnés** (saucisses, langue de boeuf, rillettes, saumon fumé etc.).[9]

III.1. Lait et Produits Laitiers

La contamination par *Listeria monocytogenes* des fourrages conservés, et notamment des fourrages fermentés (balles rondes enrubannées, ensilages), est la première étape de la principale voie de contamination du lait dans les élevages. La faible contamination des fourrages verts en est à l'origine. La fréquence de

contamination de l'herbe ou du maïs avant récolte est très variable sans que l'on en connaisse précisément les raisons. Les fourrages fermentés favorisent le développement de *Listeria monocytogenes* s'ils sont réalisés ou conservés dans de mauvaises conditions. La contamination du foin a été observée. Cependant, les données existantes ne permettent pas de comparer les fréquences et les niveaux de contamination respectifs des différents fourrages. Le risque de contamination des fourrages fermentés peut être réduit en respectant les bonnes pratiques de réalisation. Au delà du tri et de la non distribution des couches superficielles du fourrage, des pratiques rigoureuses d'hygiène lors de la traite réduisent considérablement ou éliminent les risques de contamination du lait. Des voies d'amélioration semblent possibles, qui nécessiteraient des recherches complémentaires: mieux connaître la répartition de la contamination dans les silos pour mettre en place une méthode de surveillance de la qualité des ensilages, évaluer les risques liés à la nature des fourrages, étudier l'efficacité des conservateurs, caractériser l'excrétion fécale en lien avec le régime alimentaire. [21,32]

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 microorganisme. 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 tanks à lait étaient contaminés par *Listeria monocytogenes*. [1]

Les produits laitiers sont les seuls à être soumis à une législation qui exige l'absence totale de *Listeria monocytogenes* dans les produits à la sortie d'usine. A ce stade, il suffit que la bactérie soit détectée - ne serait-ce qu'à l'état de trace- pour que l'alerte soit donnée et que le lot concerné soit interdit à la vente. Compte tenu de

l'omniprésence des *Listeria* dans l'environnement et de la finesse croissances des analyses, les alertes et les retraits du marché de produits laitiers sont plus nombreux aujourd'hui qu'hier, même en l'absence de danger pour la santé publique.

La *Listeria* est tuée, comme tous les autres microbes ou bactéries, par la pasteurisation. Mais une contamination peut ensuite survenir à tout moment, par l'environnement ou par contact avec un autre aliment contaminé : il faut savoir que la *Listeria* se multiplie entre 4° et 45° et est capable de survivre aux températures de congélation.

Dans les produits laitiers, la réglementation sanitaire est très précise vis à vis de *Listeria monocytogenes* : en effet, la directive communautaire 92/46 du 16 juin 1992 impose, au stade de la fabrication, l'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 grammes de fromage, voire dans 1gramme (fromages à pâte dure, autres produits laitiers). A la distribution, un avis du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF) fixe le critère de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme comme seuil maximum admissible au stade de la consommation, un seuil qui vaut d'ailleurs pour tous les aliments.[25,31]

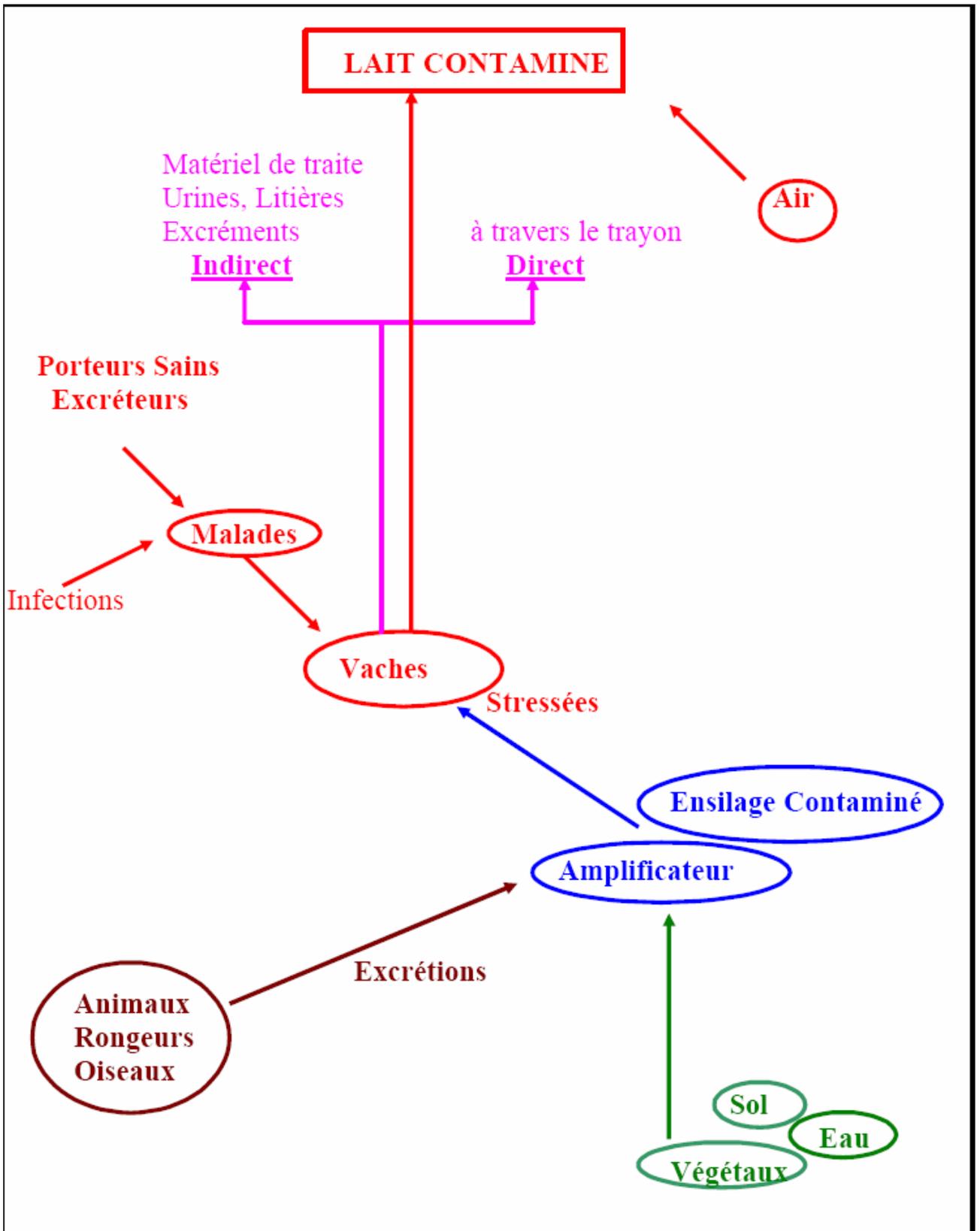


Schéma n°3 : Cycle de contamination du lait [1]

III.1.1- Les possibilités de croissance dans les fromages

La plupart des produits tiennent leur stabilité vis-à-vis du développement de *Listeria monocytogenes* suite à la combinaison des paramètres acidité et activité d'eau (aw). Le (tableau5) ci-dessous reprend les caractéristiques des différents types de fromages en fin d'acidification.

Tableau 5 : Valeurs de PH et d'aw des fromages

Catégorie de fromages	PH	aw
Pâte fraîche	4.3 - 4.5	0.98 – 0.99
Pâte molle	4.5 - 4.8	0.97 – 0.99
Pâtes pressées	4.8 - 5.2	0.94 – 0.97
Pâte dures	5.0 - 5.2	0.88 – 0.90

Le développement de *Listeria monocytogenes* est maîtrisé :

- dans les pâtes fraîches par le PH (<4.5) ;
- dans les pâtes dures par l'activité de l'eau (<0.92) ;
- dans les pâtes pressées par la combinaison du PH et de l'activité de l'eau.

Lors de l'affinage, les enzymes d'origine microbienne participent très activement aux modifications de texture et au développement de la flaveur, ce qui confère ses caractéristiques organoleptiques aux fromages. Ce phénomène provoque également une remontée de la valeur du PH au niveau de la croûte. Cette augmentation de pH et les conditions d'aérobiose en surface sont des conditions favorables au développement de *Listeria monocytogenes*. Pour cette raison certaines croûtes, dont celles des pâtes molles, présentent un risque de contamination élevé. [41]

III. 2 - Viandes et Produits carnes

Les produits carnés sont une cause importante d'épidémie et les cas rapportés sont en augmentation et non en diminution comme pourrait le faire croire les efforts d'hygiène des industriels.

III.2.1 - les produits carnes crus :

Le muscle de la viande, quel que soit l'espèce de l'animal, est un excellent milieu de culture pour les micro-organismes. De plus, la distribution à longue distance, nationale ou internationale, est la cause de la dispersion des agents pathogènes. Des contaminations croisées peuvent se produire tout au long de la chaîne de fabrication du produit viande et ultérieurement en cuisine. [27]

1/ - les modes de contaminations

La contamination peut être agonique (lors de l'abattage) et post mortem (lors de la préparation des carcasses). Ce qui explique :

- une contamination profonde des carcasses. Elle est peu importante pour les animaux sains mais non négligeable pour une carcasse quand il s'agit de bactéries intestinales.
- une contamination superficielle des carcasses est plus importantes sur l'aire d'abattage, dans les ateliers de découpe ou les chambres de stockages.

L'origine exogène rend inefficace les règles d'hygiène qui doivent présider à la transformation de la viande. De plus, la préparation des bovins, ovins, équins (figure 1) et porcins (figure 2) est propice aux contaminations d'origines humaine et animale, et aussi par l'eau. Les postes d'abattage de la peau pour les bovins, l'étourdissement et l'accrochage des carcasses des porcs échaudés. [27]

<p>Figure 1 : Préparation des bovins, ovins ou équins à l'abattoir (d'après Jouve, La qualité microbiologique des aliments)</p> <p>Réception des animaux</p> <p>Amenée</p> <p>Etourdissement, saignée</p> <p>Préparation</p> <p>Transfert de convoyeur</p> <p>Habillage</p> <p>Fente (bovins, équins)</p> <p>Emoussage (bovins, équins)</p> <p>Douchage</p> <p>Ressuage</p>	<p>Figure 2 : Préparation des porcins à l'abattoir (d'après Jouve, La qualité microbiologique des aliments).</p> <p>"Les points à risque sont en rouge"</p> <p>Réception des animaux</p> <p>Amenée</p> <p>Etourdissement, saignée</p> <p>Echaudage</p> <p>Epilage, flambage, grattage</p> <p>Eviscération</p> <p>Fente</p> <p>Ressuage</p>
--	---

2/ - les caractéristiques microbiologiques

Les animaux peuvent être des porteurs sains de *Listeria*. Les carcasses et les viandes de découpe en hébergent fréquemment mais en quantité faible (moins de 100/gramme ou

cm²). Selon les pays, la viande est plus ou moins contaminée. Ainsi, les *Listeria* détectées sont en quantité supérieure à 1000 UFC/gramme dans 55% des échantillons de viandes au détail en Australie, et seulement 4% en Norvège. Cependant, le risque potentiel de listériose lié à leur consommation n'est pas réellement connu. C'est trop souvent le cas pour les viandes hachées. En effet, alors que les *Listeria* n'ont pas été détectées dans les carcasses de boeufs, on les retrouve dans les viandes hachées.

La présence de *Listeria monocytogenes* est en général associée avec de fortes populations de bactéries aérobies, Gram négatif et bactéries lactiques *Listeria monocytogenes* ne se développe pas dans la viande à pH inférieur à 5.8, emballée sous vide et stockée entre 2°C et 4°C, du fait de la présence des bactéries lactiques. Pour des températures de stockage de 7°C à pH supérieur à 6°C, *Listeria monocytogenes*, *Brochetrix thermosphacta* et *Enterobacteriaceae* constitue la flore dominante.

III.2.2 - les produits carnés transformés

Ceci concerne les viandes cuites et les produits de la charcuterie et de la salaison. Les produits de charcuterie sont préparés avec un mélange de viande et de graisse de porcs qui peuvent être crues (saucissons, chair à saucisse). Ces types de produits ont souvent été incriminés dans les épidémies de listériose et les *Listeria* sont présentes en proportion importante (tableau 6). [27]

Tableau 6: *Listeria monocytogenes* dans les produits carnés fermentés (Larpen, 1995).

Pays	<i>Listeria monocytogenes</i>	Produits
U.S.A.	20%	Saucisses fermentés
G.B.	16%	Saucisses et salamis
	52%	Saucisses
	8%	Salamis et saucissons cuits
	3%	Jambons
Italie	57%	Salamis

1 /- Les modes de contamination

Les contaminations bactériennes peuvent se faire par la viande utilisée qui est elle-même contaminée. Les manipulations à répétitions des différents constituants posent aussi des problèmes. Elles sont directement liées à l'hygiène du personnel, du matériel et des locaux. Dans ce type de produit, il faut savoir que l'addition volontaire de bactéries est courante dans le cadre des procès.

Listeria monocytogenes est retrouvée dans 10% des charcuteries à consommer après cuisson. Les charcuteries crues à consommer en l'état sont contaminées dans 22% des cas sur 101 échantillons de pâtés. Les *Listeria* se développent à 4°C sur plusieurs types de produits (jambons, saucissons...). La flore saprophyte est d'environ 10^6 bactéries/gramme au maximum sur les saucissons, alors qu'elle est plus faible sur le jambon sec ($5 \cdot 10^2$ à 10^3). Le nombre diminue durant la fermentation des saucisses et reste ensuite constant pendant 20 jours de stockage à température ambiante. *Pediococcus acidilacti* réduit la population de *Listeria monocytogenes*. La production de sakacineA par *Lactobacillus* empêche la multiplication du pathogène pendant 7 jours de stockage de viande de boeuf à 8°C.

Dans les produits à base de viande, les caractéristiques physico-chimiques du produit influent largement sur la résistance thermique des *Listeria*. A 62.8°C, *Listeria* est 4 fois plus résistante à la chaleur que *Salmonella* (2.7 à 6 minutes). Cette thermo résistance est augmentée par les nitrites et d'autres composants sont déterminants pour la diminution de la flore bactérienne. Les additifs peuvent jouer un rôle important : l'ajout de nitrite, dextrose, lactose, sirop de grain et 3% de sel à de la chair à saucisse augmente significativement la thermo résistance de *Listeria* (Cerlier, 1995). Sur des tranches de boeufs précuites et post pasteurisées, le traitement le plus efficace pour l'élimination de *Listeria monocytogenes* est 96°C pendant 5 minutes (Larpent, 1995).

Une étude a été réalisée (Carlier, 1995) où des jambons ont étéensemencé par *Listeria monocytogenes* avant cuisson à un barème à coeur (58.8°C pendant 32 minutes). Le jambon contaminé faiblement (10^4 Lm/gramme de jambon), censé représenter le cas général, *Listeria monocytogenes* n'a pas été retrouvée avant les 70 jours de stockage. Dans le jambon fortement contaminé ($3.9 \cdot 10^5$ /gramme), la souche *Listeria monocytogenes* a pu être ré isolée à faible niveau après 55 à 65 jours de stockage, ce qui prouve la thermo résistance. Cependant la fédération française des

Industries Charcutières recommande l'utilisation de barèmes de cuisson intégrant une marge de sécurité suffisante soit :

- une température à coeur de 65°C minimum.
- une valeur pasteurisatrice de 40 minutes minimum.

2 / - Les Critères Microbiologiques pour la recherche de *Listeria*

Dans la deuxième édition de "la microbiologie des aliments" (1996), contrairement à la première, *Listeria monocytogenes* devient un critère microbiologique standard impératif au même titre que *Salmonella* (tableau 7). De plus, la référence autres espèces de *Listeria* montre l'importance donnée au genre pour les contaminations des produits carnés transformés [27]

Tableau 7 : Critères microbiologiques des *Listeria* dans les aliments
(D'après Jouve, *La microbiologie des aliments*, 2ème édition, 1996).

	<i>Listeria monocytogenes</i> /g critères standard	<i>Listeria</i> spp/g lignes directes
Produits crus, consommés en l'état (jambon cru, coppa, saucisson sec, salami, chorizo...)	m = 100 Me = 5m c/n = 2/5	m = 100 M = 1000 c/n = 2/5
Produits crus à consommer après cuisson (poitrine, lardons,...)	idem	idem
Produits cuits	m = absence dans 0.01g	m = 100 M = 1000 c/n = 2/5
Produits cuits d'un volume suffisant (terrines, pièces, pains) (prélèvement en profondeur et en surface)	m = absence dans 25g	-

III.3 - Poissons et produits de la pêche

1/ - Flore des poissons et crustacés

La chair d'un animal sain est stérile, par contre la peau, les branchies et les intestins (lorsque le poisson s'alimente) hébergent une flore commensale plus ou moins abondante.

Les micro-organismes isolés des branchies, intestin et peau sont : *Pseudomonas* ; *Acinetobacter* ; *Corynebacterium* ; *Flavobacterium* ; *Micrococcus*, les genres *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Proteus*, *Serratia* sont également rencontrés. La flore totale

des crustacés et des mollusques est également très variable. C'est quasiment la même que chez les poissons avec une proportion plus importante des Corynobactéries. [28]

2 / - la présence de listeria

Parmi 227 souches de *Listeria monocytogenes* isolées de produits de la mer, 147 appartiennent au sérotype 1-2 et 80 au sérotype 4b. La présence de la bactérie est plus fréquente dans la chair de crabe, la crevette et le saumon.

L'analyse de 227 échantillons collectés aux USA montre que *Listeria spp.* est plus fréquente dans les crevettes que dans l'eau et qu'elle n'est jamais détectée dans les huîtres. Seulement 5% des échantillons testés sont contaminés par *Listeria monocytogenes*. Le taux de contamination des crevettes est faible.

Dans les produits de la mer et les salades à base de fruits de mer, sur 128 échantillons d'aliments consommés en général sans chauffage, *Listeria spp.* est présente dans 56% des échantillons de poissons crus, 29% de poissons fumés, 9% des crevettes et 32% des salades. On n'en détecte pas dans les coquillages ni dans les poissons séchés. *Listeria monocytogenes* est présente dans 46% des échantillons positifs, seuls ou avec *Listeria innocua*.

Une enquête révèle aux USA que 24,3% des crevettes crues congelées importées entre juillet et octobre 1987, sont porteuses de *Listeria spp.* de même 12,5% d'échantillons de viandes de crabe cuites sont positifs avec 8,3% de *Listeria monocytogenes*. La présence de cette espèce est au moins aussi importante que dans le lait et certaines variétés de fromages. Au Canada, *Listeria* a été isolée de 43 sur 258 échantillons (16,7%) de produits de la mer fumés et réfrigérés. Des 43 *Listeria* isolées, 18 (41,9%) sont des *Listeria innocua*, 13 (30,2%) des *Listeria welshimeri* et 12 (27,9%) *Listeria monocytogenes*. [28,29]

Il existe une présence assez fréquence de *Listeria spp.* dans les produits fumés (près de 50%) et 30% des filets utilisés pour la matière première. Les espèces les plus couramment identifiées sont : *Listeria innocua* (38%), *Listeria welshimeri* (30%), *Listeria seeligeri*, *Listeria murrayi* (15 et 12%).

Listeria monocytogenes a été isolée dans 40% des filets fumés et dans 50% des matières premières. Toutefois *Listeria spp.* est moins souvent isolée dans les

produits fumés à chaud : la phase de montée en température, si faible soit elle (60°C à coeur pendant 20 à 30 minutes, environ) pourrait suffire à assainir le produit.

Listeria monocytogenes est capable de se développer à 4°C dans du saumon fumé, des crevettes, de la chair cuite de crabe et des homards artificiellement inoculés. Cette bactérie se développe d'avantage dans le homard et la chair de crabe. Dans des tranches de saumon fumé emballées sous vide et conservées à 4°C, le niveau de contamination reste constant durant les six premiers mois excepté dans deux échantillons. L'analyse microbiologique de 56 échantillons de différents poissons fumés emballés sous vide révèle la présence du pathogène dans un échantillon d'espadon et de *Listeria innocua* dans du saumon.

Sur 236 échantillons de saumons fumés provenant de 3 fabriques suisses, 14,4% des échantillons sont positifs pour les *Listeria* et 7,2% pour *Listeria monocytogenes*. La matière première est plus contaminée (28,6%) que le produit fini qui, après 10 jours à 4°C n'était contaminé qu'à 6,3%. [28,29]

III.4 - Volailles et Ovo produits

III.4.1 - Volailles

L'animal vivant est la principale source de contamination. *Clostridium perfringens* et *Staphylococcus aureus* sont fréquemment décelés dans le sol, la poussière et les matières fécales des volailles et de leurs bâtiments d'élevage. Ils se développent sans causer (sauf exception) des graves maladies pour les animaux.

Peu de données littéraires sont accordées aux *Listeria* dans les volailles. Cependant, les risques ne sont pas nuls puisque 36% des échantillons de poulets prélevés en Italie contenaient des *Listeria*. D'ailleurs, Larpent (1992) affirme que l'air des poulaillers peuvent en autres contenir des *Listeria*. Pour Jouve (1993), *Listeria monocytogenes* n'est pas retenu dans les critères microbiologiques des volailles. [30]

III.4.2 - Oeufs Et Ovo produits

Les ovo produits sont des produits obtenus à partir de l'oeuf, de ses différents composants ou de leurs mélanges après élimination de la coquille ou des membranes. Ils sont destinés à la consommation humaine et peuvent être partiellement complétés par d'autres denrées alimentaires ou additifs. Les ovo

produits sont sous formes liquides, concentrés, séchés, cristallisés, complétés, surgelés ou coagulés.

Les oeufs et ovo produits sont responsables de 49.1% de T.I.A. en France. Selon Larpent (1993), les oeufs ne jouent pas un rôle important dans l'épidémiologie des listérioses humaines. D'ailleurs, Jouve (1993) ne fait pas référence aux *Listeria* dans les critères microbiologiques des oeufs et des ovo produits. Cependant, des oeufs consommés crus ont été la cause d'épidémies de listérioses. Le contenu de l'oeuf est habituellement stérile, toutefois lors du cassage, les oeufs en mélange vont être contaminés par différents types de micro-organismes provenant de la coquille, du matériel, de l'atmosphère, des eaux de lavage ou encore du personnel. La durée de vie des ovo produits dépend de la contamination initiale des produits, du traitement thermique appliqué et des conditions de stockage. Des traitements, tels que la concentration, la congélation et séchage, permettent une prolongation de la durée de conservation. [30]

III.5 - Produits d'origine Végétale

Avant récolte, *L. monocytogenes* peut être apportée sur les légumes par le sol enrichi en matière organique ou par l'eau d'irrigation. En conditions d'humidité non saturante, la bactérie disparaît rapidement (en quelques dizaine heures) de la surface des végétaux. Néanmoins, une fraction des *L. monocytogenes* survit dans un état « viable mais non cultivable » (VNC). Bien que toujours viables, les cellules VNC s'avèrent incapables de se multiplier lorsque les conditions à la surface du végétal redeviennent favorables. Le risque après récolte peut donc s'apprécier sur la base des seules *L. monocytogenes* cultivables. *Certains facteurs à la surface des végétaux pourraient améliorer la survie de L. monocytogenes* en conditions d'humidité réduite, comme la présence de solutés compatibles, qui seraient utilisés par la bactérie selon des mécanismes d'adaptation au stress osmotique différents de ceux actuellement connus. Les fluctuations du nombre de *L. monocytogenes* lors de la transformation des légumes en produits prêts à l'emploi, puis lors de leur commercialisation sous chaîne du froid sont estimées par modélisation et « appréciation quantitative des risques ». La contamination provenant du champ est généralement peu élevée (inférieure à 1 *L. monocytogenes*/g de végétaux), ce qui explique de ce fait sa présence dans un faible pourcentage de produits commerciaux. Le modèle d'appréciation des risques permet d'identifier les facteurs contribuant le

plus fortement à la multiplication, ou à la maîtrise, des populations de *L. monocytogenes* dans les produits transformés.

III.5.1 - Les produits de IV^{ème} gamme

Définition : Produits végétaux conditionnés en unités ménagères ou collectives, crus, frais, ayant fait l'objet d'un épluchage, coupage ou tout autre opération touchant l'intégrité du produit.

Le risque d'intoxication par des pathogènes est très réduit (pas de cas signalés en France sur 7 ans de commercialisation). Mais il existe un risque potentiel de développement de *Listeria monocytogenes*.

Dans les produits végétaux crus (contaminations accidentelles). En effet *Listeria monocytogenes* a été rencontré dans des échantillons crus non lavés de choux, concombres, champignons, pomme de terres et radis, mais n'a jamais été rencontré dans les brocolis, les carottes, le chou-fleur ou les tomates. *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* et *Listeria seeligeri* se retrouvent respectivement dans 5,0; 2,6; 0,8 et 1,3% de tous les échantillons examinés (1000) avec 82% de sérotype 1a et 18% de sérotype 4a/ 4b. La présence de *Listeria monocytogenes* est plus grande dans les radis et les pommes de terre.

Sur les salades préemballées, *Listeria monocytogenes* sérotype 1/2a a été détectée dans 6,7% des échantillons, le sérotype 4b était aussi présent dans l'échantillon aux températures de réfrigération. La tomate (salade composée) ne constitue pas un bon substrat pour les *Listeria*.

Dans les produits végétaux bruts (pommes de terres, radis, feuilles externes des salades et des choux), la contamination est la plus élevée.

Dans les produits préparés (épluchage, parage, lavage, désinfection) la contamination est rare et les opérations de préparation contribuent efficacement à l'élimination des *Listeria*. A partir des carottes râpées, on n'isole pas de *Listeria*. Pour les légumes feuilles, le lavage et le traitement par le chlore actif n'ont qu'un effet limité. [31]

- **Effet de la chloration de l'eau de lavage sur *Listeria monocytogenes***
(Michard J., 1993)

On considère que la chloration de l'eau de lavage diminue la flore *Listeria* de 1 Log :

(Temps action eau chlorée = 2-5 mn ; [chlore actif] = 10-100 ppm). Un lavage à l'eau diminue la flore *Listeria* de 0,6 Log

Le nombre de *Listeria* évolue peu sur les brocolis ou les choux-fleurs, les asperges.

Les atmosphères modifiées semblent n'avoir aucune influence. Dans des salades mixtes italiennes, aucune *Listeria monocytogenes* n'a été isolée.

On peut remarquer que le taux de contamination se situe à un niveau peu élevé d'autant que la durée de vie courte des produits limite leur développement. La recherche de *Listeria monocytogenes* doit être régulièrement réalisée par les entreprises.

La mise en évidence de manière ponctuelle à la production, de Salmonelle et de *Listeria monocytogenes* doit se traduire par le retrait du lot et la recherche immédiate des causes et selon les résultats, par la modification des options de maîtrise et de surveillance.

La mise en évidence à la distribution doit inclure dans cette recherche les phases de transport et de stockage. Dans les deux cas, une mise en évidence persistante doit se traduire par un renforcement de la recherche de ces germes et par la mise en place d'opération de maîtrise spécifique devant inclure des opérations de retour de produit et de désinfection complète des locaux de production. Les critères proposés pour les salades à l'exception du cresson et pour les légumes râpés et/ou émincés sont:[31]

	n	c	m
<i>L. monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 0,001g

Lorsque m est atteint, on rappelle les produits et on met en place des actions correctives.

1 /- Salades en saucées Les légumes crus ou cuits avec sauce plus éventuellement d'autres denrées alimentaires (si d'origine animal moins de 25%). En ce qui concerne les critères microbiologiques, ils sont identiques aux produits de IVème gamme.

2/- Graines germées crues

Exemple : Haricot mungo = soja, luzerne, lentille. La présence de *Listeria monocytogenes* entraîne un risque de listériose humaine. Si il y en a cela entraîne une non commercialisation du lot ou retrait. Il faut alors réaliser un nettoyage, une désinfection renforcée et augmenter la fréquence des analyses microbiologiques. [31]

II.6- Influence des modes de conditionnement sur la croissance de *Listeria monocytogenes*

Dans la plupart des expériences, l'emballage sous atmosphère modifiée n'a pas un effet inhibiteur décisif sur la croissance de la bactérie, quoiqu'il soit en général plus marqué que celui de l'emballage sous vide ; le résultat n'est probant que dans certains essais, lorsque l'atmosphère modifiée est anaérobie (100% CO₂ ou 100% N₂), surtout si la température est basse. [40]

Tableau n° 8 : Récapitulation des résultats relatifs à *listéria monocytogénés* [40]

	Produit	Tempér.	Croissance de listéria monoc.		
			Sous air	Sou vide	Sous atm. modifiée
Berrang et al. 1989	Légumes	4°C 15°C	(+) ou (Ø) (+ +)		(+) ou (Ø) (+ +)
Gill et reichel,1989	Vian. de bœuf PH>6.0	10° C 5° C 2° C 0° C		(+ +) (+ +) (+) (Ø)	(+ +)
Grau et Vanderlinde, 1990	Vian. de bœuf, PH5.5 à 5.7 Vian. de bœuf, PH6.0 à 6.1	0°C 5.3° C 0° C		(Ø) (+) (Ø)	
Hudson et al.1994	Vian. de bœuf	-1.5° C 3° C		(+) (+ +)	(-) (+)
Avery et al. 1994	Vian. De bœuf	5° C 10° C		(+ +) (+ + +)	(-) (-)
Ingham et al.1990	Vian. de volaille	3° C 7° C 11° C	(+ + +) (+ + +) (+ + +)		(+) (+ +) (+ +)
Wimpfheimer et al.1990	Vian. De volaille	4° C 4° C	(+ +)		(-) sous atm. Anaérobie (Ø) sous atm. Aérobie
Marshall et al. 1991	Vian. De volaille	3° C 7° C 11° C	(+) (+ +) (+ + +)		(+) ou (Ø) (+) (+ + +)
Farber et Daley, 1994	Vian. De volaille	4° C 10°C	(+) (+ + +)		(+) ou (Ø) (+) ou (Ø)
Van Laack et al. 1993	Viande de porc	1° C	(+)	(+)	

On peut en conclure que ni l'emballage sous vide ni l'emballage sous atmosphère modifiée ne garantissent systématiquement une protection suffisante contre la croissance de *l.m* au cours d'un stockage prolongé, le risque étant bien entendu d'autant plus grand que la température est plus élevée. [40]

CHAPITRE IV

Risque microbiologique lié à la *listeria monocytogenes*

Dans les aliments prêts à consommer

IV.1. Identification des dangers

IV.2. Les aliments et le risque de contamination par la *listeria monocytogenes*

IV.3. Classification des aliments selon le danger représenté par *listeria monocytogenes*

IV.4. Exemple de maîtrise de risque d'apparition *listeria monocytogenes* dans la transformation laitière fermière

L'évaluation quantitative des risques microbiologiques dans les aliments est un domaine de travail prioritaire pour la commission du Codex Alimentarius. À sa trente-deuxième session, le Comité du Codex sur l'hygiène alimentaire (CCFH) a établi une liste de combinaisons pathogènes-produits pour lesquelles il a demandé l'avis d'experts en évaluation des risques. Pour répondre à cette requête et à d'autres besoins de leurs pays membres, l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont lancé conjointement un programme de travail dont l'objectif consiste à fournir des avis d'experts sur l'évaluation des risques des dangers microbiologiques dans les aliments.

Le programme d'activités FAO/OMS sur l'évaluation des risques microbiologiques vise à servir deux clients –la commission du codex Alimentarius et les pays membres de La FAO et de l'OMS. La commission du Codex Alimentarius, et en particulier son organe subsidiaire, le CCFH, a demandé des avis scientifiques éclairés qui serviront de base pour élaborer des lignes directrices et des recommandations pour la gestion des risques microbiologiques dans les aliments et a identifié 21 combinaisons pathogènes-aliments posant problème (Commission du Codex Alimentarius, 1999a). Les pays membres ont à nouveau insisté sur la nécessité des évaluations des risques adaptables qu'ils puissent utiliser pour conduire leurs propres évaluations. Ils ont en particulier indiqué qu'il serait bon de disposer de modules qui puissent être directement appliqués à leur situation nationale. Tenant compte de ces besoins, la FAO et l'OMS ont commencé à étudier un certain nombre de combinaisons pathogènes-aliments, dont l'une d'entre elles est *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer. [34,35]

IV.1. Identification des dangers

La listériose est attribuable en grande partie à la transmission du microorganisme par les aliments. Chez l'homme, la listériose prend généralement la forme de cas sporadiques ou de poussées épidémiques largement diffuses dans le temps ou dans l'espace, parfois dans les deux. Si les modes de transmission de *L. monocytogenes* peuvent comprendre la transmission verticale (de la mère à l'enfant), zoonotique (de l'animal à l'homme) ou nosocomiale (contractée à l'hôpital), ce n'est qu'après que plusieurs poussées importantes de sources communes de listériose se sont produites en Amérique du Nord et en Europe durant les années 1980 que l'on a reconnu

l'importance des aliments comme principale voie de transmission pour l'exposition humaine à *L. monocytogenes* (Broome, Gellin et Schwarz, 1990; Bille, 1990). Les aliments le plus souvent associés à la listériose chez l'homme comprennent les aliments prêts à consommer ayant subi une transformation industrielle qui

- favorisent la croissance de *L.monocytogenes*,
- se conservent longtemps au réfrigérateur,
- sont consommés sans autre traitement listéricide, par exemple la cuisson (Pinner et al., 1992; Rocourt, 1996; FDA/FSIS, 2001; Nørrung, Andersen et Schlundt, 1999).

En raison de la gravité de la maladie la listériose s'inscrit parmi les plus élevés des maladies d'origine alimentaire (Roberts, 1989; Roberts et Pinner, 1990).

-Les infections par *L. monocytogenes* peuvent menacer la vie (taux de mortalité de 20 à 30 %), une bactériémie, des infections du système nerveux central (méningite, encéphalite, méningo-encéphalite), les fausses-couche, les naissances prématurées, les accouchements de mort-nés et les maladies néonatales.

-La période d'incubation peut être longue, en général deux à trois semaines, voire jusqu'à trois mois (Gellin et Broome, 1989).

-La listériose est une maladie relativement rare. Il y aurait chaque année 0,1 à 11,3 cas par million de personnes (référence citée dans Notermans et al. 1998), 0,3 à 7,5 cas par million de personnes en Europe (CE, 2003).

-Elle est largement distribué dans l'environnement et a été isolé dans de nombreuses sources (le sol, la végétation, les produits d'ensilage, les matières fécales, les eaux usées et l'eau).

-Un hôte transitoire dans l'intestin des humains, 2 à 10 % de la population générale, selon l'examen d'échantillons de matières fécales, étant porteurs de l'organisme sans conséquences négatives apparentes sur la santé. (Farber et Peterkin, 1991; Rocourt et Cossart, 1997; Skidmore, 1981; Slutsker et Schuchat, 1999; Mascola et al., 1992; Schuchat et al., 1991).

-Le pathogène peut se développer en grand nombre à des températures de réfrigération au bout d'un certain temps. *L. m* est plus résistant à diverses températures ambiantes que beaucoup d'autres bactéries pathogènes d'origine alimentaire non sporulées, ce qui lui permet de survivre plus longtemps dans des conditions défavorables (McCarthy, 1990; Ryser and Marth, 1991).

-*L. m* est présent dans :

- de nombreux milieux de transformation des aliments (Ryser et Marth, 1991, 1999), et peut survivre pendant de longues périodes dans les aliments,

- les usines de transformation des aliments,

- les maisons et les établissements de restauration ou dans l'environnement, en particulier à des températures de réfrigération ou de congélation.

La capacité de *L. monocytogenes* de se développer et de survivre dans les aliments et les systèmes modèles a fait l'objet d'études approfondies et des modèles mathématiques sont disponibles qui décrivent l'effet des divers paramètres environnementaux sur la croissance et la survie des microorganismes.

L. m est souvent présent dans les aliments crus d'origine tant animale que végétale et peut devenir endémique dans les milieux de transformation des aliments.

Il est également présent dans les aliments cuits à cause de la contamination après transformation ou d'un traitement thermique insuffisant (*L. m* a été isolé dans des aliments tels que le lait cru nature et pasteurisé, les fromages pâte molle, les crèmes glacées, les légumes crus, la viande crue fermentée, les saucisses cuites, la volaille crue et cuite, les viandes crues et les fruits de mer crus et fumés (Buchanan et al., 1989; Farber et Peterkin, 1991; FDA/FSIS, 2001; Ryser et Marth, 1991, 1999).

Une étude d'une gamme d'aliments prélevés dans les réfrigérateurs de patients atteints de listériose aux États-Unis a montré que des isolats de *L. m* dans les aliments impossibles à distinguer de la souche du patient pouvaient être isolés de 33 % des réfrigérateurs (Pinneret al., 1992). [36]

IV.2. Les aliments et le risque de contamination par la *Listeria monocytogenes*

Le centre des modèles d'évaluation de l'exposition devait représenter la fréquence et l'ampleur de la contamination dans les aliments entre le point de vente et le point de consommation. Cela a simplifié la modélisation et réduit les incertitudes du modèle, diminuant ainsi les fourchettes des estimations du risque final. Les modèles établis décrivent la croissance ou la diminution de *L. monocytogenes* entre le moment de l'achat et la consommation, à l'aide d'informations et de modèles pour le taux de croissance de *L. monocytogenes* tel qu'affecté par la température de stockage et la composition de l'aliment, le temps mort tel qu'affecté par la température de stockage et la composition de l'aliment, la croissance maximale de *L. monocytogenes* soutenue par l'aliment et la répartition des durées et des températures de stockage au point de vente au détail et dans les foyers. Pour calculer le nombre de *L. monocytogenes* réellement ingérés, il a fallu aussi prendre en compte la gamme des poids des portions et la fréquence de la consommation de l'aliment (c'est-à-dire le nombre de portions).

On a choisi quatre aliments qui illustrent la manière dont les différents facteurs susmentionnés interagissent pour influencer sur le risque de listériose par million de portions et le risque dans un pays pour 100 000 personnes par an. La dernière estimation tient compte de l'impact des taux de consommation des différents aliments sur le risque pour la santé publique.

1. Lait

Le lait est un aliment très fréquemment consommé dans de nombreux pays occidentaux et en grande quantité par portion. En tant que produit agricole à l'état brut, il est souvent contaminé, mais une pasteurisation correcte élimine les microorganismes. On suppose que des mesures de contrôle sont en place de manière à ce qu'aucun lait non pasteurisé ne soit emballé pour la distribution et qu'il soit rare qu'une recontamination puisse se produire avec un petit nombre de microorganismes durant l'opération d'emballage. Le lait a une durée de conservation moyenne lorsqu'il est réfrigéré et le microorganisme peut se développer assez rapidement durant le stockage. En raison de la durée de conservation et de la vitesse de croissance, il peut y avoir de fortes densités de microorganismes. Le risque par portion est faible (5.0×10^{-9} cas par portion), toutefois, la très grande fréquence de la consommation

fait que le lait contribue largement au nombre total de cas de listériose par an prévus (0,09 cas pour 100.000 personnes).

2. Crèmes glacées

Les crèmes glacées partagent avec le lait de nombreuses caractéristiques, mais étant un aliment congelé, *L.monocytogenes* ne peut se développer durant le stockage. Elles sont consommées avec une très grande fréquence et en assez grandes quantités par portion. Le mélange de crèmes glacées peut être contaminé mais la pasteurisation élimine le microorganisme. Une recontamination peu fréquente avec de petits nombres de *L.monocytogenes* peut se produire durant le mélange, la congélation et l'emballage. Des pathogènes peuvent aussi être introduits si le produit contient des ingrédients supplémentaires, par exemple des noisettes, du chocolat ou des fruits. Aucune croissance du pathogène ne se produit durant le stockage au congélateur et la contamination au point de consommation est la même que la contamination dans le milieu de production. D'après les estimations, le risque par portion serait très faible ($1,4 \times 10^{-11}$ cas par portion) et bien que très fréquemment consommées, les crèmes glacées ne contribuent pas largement au nombre total de cas de listériose par an dans une population (0,00012 cas pour 100.000 personnes).

3. Poisson fumé à froid

Le poisson fumé (qui est en grande partie du saumon fumé à froid) est souvent contaminé et compte parfois de grands nombres de *L. monocytogenes*. La consommation varie beaucoup d'un pays à l'autre. Elle est très forte dans certains pays d'Europe du Nord tandis qu'en Amérique du Nord elle est relativement faible. Le poids des portions est moyen (environ 60 g). *L. monocytogenes* peut se développer dans des fruits de mer fumés à une vitesse modérée lorsqu'ils sont conservés au réfrigérateur. Les durées de stockage peuvent être longues pour le poisson fumé, ce qui signifie qu'une croissance importante du pathogène peut se produire dans des échantillons contaminés. Le fumage à froid est la méthode la plus utilisée. L'impact de différentes méthodes de fumage sur la contamination n'est pas évident, mais il a été démontré que l'inactivation de *L. monocytogenes* durant le fumage à chaud est souvent neutralisée par une recontamination supplémentaire. On a estimé que le risque par portion est élevé ($5,3 \times 10^{-8}$ cas par portion). Globalement, toutefois, la consommation est modérément fréquente (1 à 18 portions par an), par conséquent, le nombre total de cas de listériose par an a été modéré (0,016 cas pour

100 000 personnes). Dans les pays où la consommation est beaucoup plus importante, par exemple ceux de l'Europe du Nord, le risque par portion seraient le même, mais le nombre de cas par an pour 100 000 personnes serait supérieur.

4. Produits carnés fermentés

Les produits carnés fermentés – en général des saucisses fermentées et sèches ou demi-sèches – affichent des taux moyens de consommation dans de nombreux pays. Le poids des portions est également moyen. Alors qu'il y a une diversité dans le monde dans la transformation et la composition de ces produits, ils sont représentés principalement par des produits comme les saucissons. Ces produits contiennent de l'acide lactique, du sel et des nitrites qui empêchent la croissance de *L.monocytogenes* et, en fait, provoquent l'inactivation du pathogène durant le stockage, en particulier à température ambiante. Certains fabricants soumettent leurs produits à une pasteurisation thermique entre la fermentation et le séchage, mais le procédé traditionnel ne comporte pas de traitement listéricide. En raison de la contamination des ingrédients de la viande désossée, ces produits affichent des taux de contamination modérés au point de vente. Ils peuvent être conservés pendant très longtemps. Toutefois, du fait que la croissance n'a pas lieu et que l'inactivation est probable durant le stockage, on observe habituellement dans les emballages contaminés une diminution du nombre de *L. monocytogenes*, d'où un très faible risque par portion ($2,1 \times 10^{-12}$). Le nombre total de cas pour 100.000 personnes et par an ne serait que de 0,0000055.

Tableau n°9: Moyenne des estimations des cas de listériose pour 100.000 personnes /an et par million de portions pour les quatre aliments choisis.

Aliment	Cas de listériose pour 100.000 personnes/ans	Cas de listériose par million de portions
Lait	0,091	0,005
Crèmes glacées	0,00012	0,000014
Poisson fumé à froid	0,016	0,053
Produits carnés fermentés	0,0000055	0,0000021

Listeria monocytogenes est un germe « à problème » en hygiène alimentaire. Sa très large distribution dans la nature rend illusoire son éradication. Il faut donc diminuer et maîtriser les sources de contamination, intégrer la maîtrise du risque à toute la chaîne de production (de la matière première au consommateur). Tous les acteurs de

la filière agro-alimentaire sont concernés. Les consommateurs doivent être informés du risque lié à la consommation de certains produits à probabilité de contamination élevée (femmes enceintes, personnes âgées, malades etc.). Le système HACCP doit être constamment sollicité pour mettre en place des démarches et systèmes de contrôle, de nettoyage et de désinfection avec la plus grande efficacité. [37]

VI.3. Classification des aliments selon le danger représenté par *L.m.*

Trois catégories d'aliments ont été définies selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*.

1. Aliments à risque maîtrisé

Ces aliments sont exempts de *Listeria monocytogenes* au stade d'achat :

- parce qu'ils sont soumis à des mesures de maîtrise microbiologique appropriées, ou
- parce qu'ils ont subi un traitement listéricide, dont l'efficacité a été démontrée pour des niveaux de contamination habituellement détectée avant traitement en fonction de la maîtrise microbiologique des étapes antérieures de la vie du produit (par exemple, traitement thermique de 65° C à coeur pendant 2 min ou traitement équivalent si la température à coeur est supérieure à 65° C, ionisation à 5 kGy).

Ces aliments sont exempts de *Listeria monocytogenes* au stade de la consommation :

- parce qu'ils sont consommés selon des recommandations appropriées portées à la connaissance du consommateur, par exemple par un système d'étiquetage (conditions de cuisson, délai de consommation après ouverture...), ou
- en l'absence de telles recommandations, parce que le mode de consommation habituel comporte une étape listéricide. [39]

2. Aliments sûrs

Les caractéristiques de ces aliments ne permettent pas la croissance de *Listeria monocytogenese*. Ainsi, ces aliments sont considérés comme ne présentant pas de risque :

- en général pour le consommateur, à condition que le niveau de contamination initiale soit conforme au seuil réglementaire ;
- plus particulièrement, pour certaines populations à risque pour lesquelles un seuil pourrait être défini sur la base d'une appréciation des risques, à condition que le niveau de contamination initiale soit inférieur à ce seuil. [39]

3. Aliments sensibles

Les caractéristiques de ces aliments permettent la croissance de *Listeria monocytogenes*. S'ils sont contaminés par *Listeria monocytogenes*, ces aliments peuvent présenter un niveau de contamination par ce micro-organisme supérieur au seuil défini comme représentant un risque pour le consommateur, sur la base d'une appréciation des risques. [39]

La classification des aliments par rapport au risque *Listeria monocytogenes* est différente selon les pays.

Voici des exemples de nomenclatures venant de l'Allemagne, du Canada, de la France, de l'Angleterre, du Danemark, de la Belgique et de l'Union Européenne.

Pour une meilleure lecture des tableaux, la succession des classes n'est pas en rapport avec l'augmentation du risque *Listeria monocytogenes*. [46]

Approche allemande (Bartelt et al. 1999)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments ayant fait l'objet d'un traitement qui assure la destruction de <i>L. monocytogenes</i> . Pas de recontamination possible
II	Aliments qui peuvent être contaminés par <i>L. monocytogenes</i> , mais qui ne permettent pas sa croissance.
III	Aliments qui peuvent être contaminés par <i>L. monocytogenes</i> et qui permettent sa croissance.
IV	Aliments, autres que ceux prêts à l'emploi, ayant fait l'objet d'un traitement thermique avant consommation.

Approche canadienne (Farber et al. 1996)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments ayant été impliqués dans des épidémies de listériose
II	Aliments avec une DLC > 10 jours, permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i>
III	Aliments avec une DLC < 10 jours, permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i>
IV	Aliments ne permettant pas la croissance de <i>L. monocytogenes</i>

Approche française (DGAI)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
A	Aliments spécialement destinés à la consommation de population à risque (aliments pour nourrissons, aliments spéciaux à usage médical etc.)
B	Aliments ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés après traitement
C1	Produits crus ou ayant subi un traitement insuffisant pour les assainir à l'exception des produits à base de lait, qu'ils soient consommés crus ou après cuisson
C2	Produits crus ayant subi un traitement assainissant puis manipulés pour le conditionnement à l'exception des produits à base de lait
C3	Produits à base de lait autres que ceux visés aux point A et B

Approche anglaise (CFDRA)

Catégorie	Niveau du risque	Nature des produits alimentaires
A	Risque faible	Aliments qui ne seront plus transformés par le fabricant
B	Risque faible	Aliments qui pourront être traités ou lavés par le fabricant ou par le consommateur
C1	Risque élevé	Aliments qui ne seront pas traités par le consommateur. Aliments conservés et/ou protégés de façon à réduire la croissance de pathogènes
C2	Risque élevé	Aliments qui sont supposés ne pas être traités par le consommateur. Aliments susceptibles de permettre la croissance de pathogènes.

Approche danoise (Norrung *et al.* 1999)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments traités thermiquement dans leur emballage définitif
II	Aliments manipulés après traitement thermique. Aliments qui permettent la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie (généralement inférieure à une semaine)
III	Aliments prêts à l'emploi, avec peu d'agents conservateurs et non traités thermiquement. Aliments permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie (généralement inférieure à trois semaines)
IV	Aliments traités thermiquement et manipulés après traitement. Aliments stabilisés vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie. Les aliments, avec une durée de vie inférieure à une semaine, sont considérés comme stables
V	Aliments prêts à l'emploi, avec peu d'agents conservateurs et non traités thermiquement. Aliments stabilisés vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie. Les aliments, avec une durée de vie inférieure à trois semaines, sont considérés comme stables.
VI	Aliments crus, aliments prêts à l'emploi.

Approche belge (Conseil Supérieur de l'Hygiène de Belgique, 1999)

Catégorie	Produits alimentaires prêts à la consommation	Critères
1	Produits avec croissance possible mais traitement thermique dans le conditionnement final.	Sortie de production Absence dans 25 g n =5, c =0
2	Produits avec croissance possible (y compris si les produits ont été congelés).	Sortie de production Absence dans 25 g sauf preuves que l'absence dans 1 g est suffisante (littérature, mesures physico-chimiques et challenge test) n =5, c = 0
3	Produits avec croissance impossible (pH < ou = 4,5 et/ou aw < 0,92).	Sortie de production Absence dans 0,01 g plus preuve que la croissance est impossible (littérature, mesures physico-chimiques et challenge test) n =5, c =0
4	Les produits crus non transformés.	Sortie de production m =Absence dans 1 g M =Absence dans 0,1 g n =5, c =1
5	Produits à la date limite de consommation.	Date limite de consommation et conservation aux conditions préconisées par le fabricant Absence dans 0,01 g n =5, c =0

Opinion exprimée par le Comité Scientifique Vétérinaire européen (1999)

Catégorie	Produits alimentaires prêts à la consommation
A	Aliments traités thermiquement jusqu'à un niveau listéricide dans leur emballage définitif.
B	Aliments manipulés après traitement thermique. Aliments qui permettent la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur DLC à la température de stockage indiquée.
C	Aliments avec des inhibiteurs faibles et non traités thermiquement. Aliments permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur DLC à la température de stockage indiquée.
D	Aliments traités thermiquement et manipulés après ce traitement. Aliments stables vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur DLC à la température de stockage indiquée.
E	Aliments avec des inhibiteurs faibles et non traités thermiquement. Aliments stables vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur DLC à la température de stockage indiquée.
F	Aliments crus prêts à consommer

VI.4. Exemple de maîtrise de risque d'apparition de *Listeria monocytogenes* dans la transformation laitière fermière

VI.4.1. Préventions de la fourche à la fourchette

La sécurité des denrées alimentaires est assurée par la mise en place d'un plan d'autocontrôle. En ce qui concerne les produits au lait cru, la maîtrise de la transformation ne peut être assurée sans une maîtrise absolue de la qualité hygiénique du lait cru.

L'autocontrôle se base sur des principes généraux d'hygiène et sur l'application de la méthode HACCP. Parmi les principes généraux d'hygiène, il faut être vigilant aux :

- Risques de contaminations croisées : disposition adéquate des locaux ou décalage des opérations contaminantes dans le temps et croisements entre locaux ou endroits de niveaux d'hygiène différents limités.
- Nettoyage et désinfection : plan de nettoyage et désinfection efficace, infrastructure, matériaux et ustensiles faciles d'entretien.
- A l'hygiène du personnel

Une fois que ces préalables sont mis en place, il faut analyser tout au long du processus de fabrication du produit concerné quels dangers peuvent apparaître. La connaissance de ces dangers permet ensuite de déterminer comment les éviter et quels paramètres doivent être surveillés pour assurer le bon déroulement de la fabrication (ce qu'on appelle les points critiques de contrôle ou CCP).

La maîtrise du risque d'apparition de *Listeria monocytogenes* dans les produits laitiers fermiers est assurée par un processus de fabrication permettant une acidification rapide, processus lui-même surveillé à l'aide d'un système d'autocontrôle efficace. La mise en place de mesures plus spécifiques à *Listeria monocytogenes* ne s'applique que si l'aliment présente un risque réel de contamination et/ou de multiplication du germe étudié. Détaillons au sein d'une production fermière (de la production primaire à la transformation), quelles peuvent être les sources d'une contamination en *Listeria monocytogenes*. [41]

1. La production primaire

Listeria monocytogenes est une bactérie naturellement présente en milieu agricole et qui peut se développer dans les ensilages présentant un défaut d'acidité (pH en périphérie > 4), d'anaérobiose ou pour lesquels la quantité de terre incorporée est

trop importante. Ces ensilages contaminés peuvent être à l'origine de contamination par l'air. Lorsque la contamination est importante, elle peut provoquer une listériose chez l'animal. L'application de bonnes pratiques d'hygiène à la traite et l'isolement des animaux atteints de listériose sont essentiels pour assurer la qualité sanitaire du lait cru. Le niveau d'hygiène à la traite peut être estimé en réalisant une analyse des coliformes totaux et des *Escherichia coli* au niveau du lait de mélange.

Plus rarement, le germe peut être excrété directement dans le lait suite à la présence de mammites à *Listeria monocytogenes* (mammites sub-cliniques, ne présentant donc pas de symptômes). A ce niveau, il faut identifier et réformer les animaux excréteurs.

Pour les produits pasteurisés, l'application de bonnes pratiques agricoles et de santé animale est suffisante. Pour les produits au lait cru, des précautions supplémentaires concernant les ensilages, les contaminations fécales, les maladies animales, les mammites à *Listeria* et l'eau sont nécessaires.

2. La transformation

Lors de la transformation de produits laitiers les contaminations potentielles par *Listeria monocytogenes* sont recherchées avec la méthode des 5M (Matière, Milieu, Méthode, Main d'œuvre, Matériel).

- **Contaminations liées à la matière première**

Afin de s'assurer de la qualité des produits, un contrôle strict doit être effectué lors de la réception des matières premières (température, DLC, ...). La matière première principale lors de la transformation laitière fermière est le lait produit dans l'exploitation. Celui-ci doit aussi être maîtrisé par un système d'autocontrôle adapté.

- **Contaminations liées au milieu et au matériel**

Les mesures préventives liées au milieu et au matériel reposent sur une maîtrise du nettoyage et de la désinfection des locaux, du matériel et des ustensiles. Une attention spécifique doit être portée aux ambiances humides et froides, favorables au développement de *Listeria monocytogenes*.

- **Contaminations liées à la main d'œuvre**

Une bonne hygiène du personnel est la mesure préventive clé pour éviter les contaminations directes ou indirectes. Idéalement, la personne affectée à la transformation se consacre uniquement à cette tâche. Si elle doit quitter la pièce, des mesures d'hygiène seront prises avant de recommencer la transformation (lavage des mains, utilisation d'un tablier réservé à la transformation, ...).

- **Contaminations et multiplications liées à la méthode**

Les causes de dangers liées à la méthode sont multiples et maîtrisées par l'application de la méthode **HACCP** :

- La multiplication des bactéries peut survenir si les températures de stockage ne sont pas respectées ou si la chaîne du froid est brisée (CCP). La température sera idéalement comprise entre 2 et 4°C;
- Pour les produits pasteurisés, le barème thermique prévu doit être correctement surveillé (CCP). Un traitement thermique de 72°C pendant 15 secondes est suffisant pour détruire la majorité des souches de *Listeria monocytogenes* ;
- Une acidification rapide et suffisante permet tout comme le froid, de limiter la multiplication de *Listeria monocytogenes*. La surveillance de la vitesse de l'acidification et le contrôle de l'acidité finale du produit sont essentiels (CCP).

- **En pratique: exemple**

111 fermes laitières ont été suivies pendant 5 ans lors de la mise en place de l'autocontrôle en transformation laitière fermière dans le cadre d'un Projet de Développement Rural financé par la région Wallonne (Direction générale de l'Agriculture) et de l'Union Européenne (Fonds Feoga). Cette mission a permis de montrer que le risque *Listeria monocytogenes* ne pouvait être assuré sans système d'autocontrôle adapté à l'exploitation et au type de produit fabriqué.

Lorsque ce système de maîtrise des dangers est en place, il est parfois nécessaire de définir des mesures de maîtrise plus spécifiques liées au risque d'apparition de *Listeria monocytogenes* en exploitation fermière. Ces dernières années, les sources de contamination suivantes ont été mises en évidence :

- l'air (ensilages, foin...),
- des travaux dans les locaux proches,
- l'humidité (air confiné)
- l'eau de puits
- contamination croisée (disposition des locaux, laiterie trop petite...)
- listériose récente dans le cheptel et/ou un animal excréteur

Ces contaminations initiales sont aggravées suite à une mauvaise maîtrise de l'acidification (pièce de maturation trop froide, ferments mal ou pas utilisés...). [41]

Conclusions

La maîtrise du risque lié à *Listeria monocytogenes* commence par la mise en place d'un système d'autocontrôle adapté à la transformation fermière. La recherche de mesures plus spécifiques à *Listeria monocytogenes* ne s'applique que si l'aliment et/ou les conditions de travail présentent un risque réel de contamination et/ou de multiplication du germe étudié. Cette étude doit être adaptée à chaque exploitation.

Pour les produits au lait cru, la prévention commence au niveau de l'élevage (qualité de l'ensilage) et de la production de lait (hygiène à la traite). Pour la transformation, la maîtrise du froid et de l'acidification permet de limiter, de stopper le développement des *Listeria monocytogenes* éventuellement présentes. [39]

Le guide suivant est proposé pour maîtriser le risque :

1) éviter de consommer des aliments crus (fromages au lait cru, poissons fumés, coquillages crus, tarama, surimi etc.) ou mal cuits. Préférer le lait pasteurisé, UHT, les fromages pasteurisés, ceux à pâte cuite comme le gruyère, les fromages fondus. Eviter de consommer des graines de soja germées. Il est aussi conseillé d'éliminer la croûte des fromages, de laver les légumes

2) éviter les contaminations croisées entre aliments crus et cuits au cours de la préparation et du stockage.

Après manipulation d'aliments crus, se laver les mains et nettoyer des ustensiles qui ont été en contact avec ces aliments. La contamination peut également provenir de l'environnement du produit alimentaire. La bactérie est ubiquitaire et les aliments peuvent être contaminés par contact avec leur environnement.

3) recuire et / ou réchauffer les aliments. Respecter scrupuleusement les règles habituelles d'hygiène : les restes et les plats cuisinés doivent être réchauffés efficacement avant consommation. *Listeria* peut contaminer des produits qui subissent une cuisson lors de leur fabrication : il s'agit pour l'essentiel des produits de charcuterie (abats, aliments en gelée, rillettes). Laisser les micro-ondes pénétrer dans le produit. Il est recommandé de bien cuire les aliments crus d'origine animale ; les steaks hachés doivent être cuits à coeur

4) éviter les pâtés et les fromages affinés ou non (Camembert, Brie). Le risque lié à la consommation des fromages frais est réduit.

5) les végétaux crus (légumes, herbes aromatiques) doivent être lavés avant consommation.

6) la DLC doit être respectée

- 7) les aliments doivent être préparés en suivant les recommandations des fournisseurs
- 8) maintenir le réfrigérateur propre ainsi que le plan de travail (désinfection avec l'hypochlorite de sodium)
- 9) entreposer les produits périssables dans la zone la plus froide du réfrigérateur ($t^{\circ} < 5^{\circ}\text{C}$)
- 10) éviter de garder des aliments périssables plus de 3 jours au frigo. [9]

Chapitre V

Méthodes de préservation des produits agroalimentaires contre *listeria* monocytogenes

V.1- Microbiologie prévisionnelle

V.2 - Techniques de diagnostic

V.1- Microbiologie prévisionnelle

La microbiologie prévisionnelle est un outil combinant des éléments microbiologiques, mathématiques et statistiques permettant de développer des modèles décrivant la croissance ou la destruction des populations microbiennes sous certaines conditions environnementales. Ces modèles permettent lorsqu'il n'est pas possible de mesurer directement l'exposition (pourcentage de contamination et concentration du microorganisme dans l'aliment au moment de sa consommation), de la prédire en fonction de la contamination primaire (matière première), des conditions d'environnement ou du traitement subi tout au long de la chaîne de production et de distribution de l'aliment.

Les principaux facteurs affectant la croissance microbienne sont le pH, l'activité de l'eau (a_w), l'atmosphère, la température et la présence de certains acides organiques comme le lactate. La modélisation de la croissance microbienne est l'un des points clés de l'appréciation quantitative des risques. Whiting et Buchanan [1993] ont proposé trois classes de modèles (Les modèles primaires, les modèles secondaires, les modèles tertiaires et les modèles sous conditions dynamiques d'environnement)

V.2 - Techniques de diagnostic

Il existe une grande variété de méthodes conventionnelles et rapides actuellement disponibles pour la détection et l'identification de *L. m* dans les aliments et à partir des prélèvements d'animaux malades.

Les méthodes bactériologiques conventionnelles sont importantes pour différentes raisons :

- elles permettent l'isolement de l'organisme en culture pure, ce qui est nécessaire en terme de réglementation.
- Elle reste la méthode de référence vis-à-vis des autres méthodes qui sont comparées et validées par rapport à celles-ci.

Ces méthodes sont fréquemment très sensibles et ne nécessitent pas de matériel sophistiqué et coûteux. Certains inconvénients de ces types de méthodes sont : des temps d'incubation relativement longs nécessaires à la réalisation du protocole, plusieurs manipulations, la nécessité de posséder de nombreux produits chimiques, réactifs et milieux différents, la contamination et la prolifération d'autres microorganismes masquant la présence de la bactérie, la possibilité de laisser passer des variants atypiques présents dans l'organisme étudié et la relative subjectivité

nécessaire lorsque l'on doit interpréter la croissance bactérienne sur des boîtes de gélose sélective et différentielle.

L'isolement et l'identification de *L. monocytogenes* dans les aliments, l'environnement ou les prélèvements vétérinaires nécessitent l'utilisation d'agents sélectifs et de procédures d'enrichissement de façon à limiter les micro-organismes contaminants à un niveau raisonnable et à permettre ainsi la multiplication de *L. monocytogenes* à un niveau suffisant pour assurer la détection de l'organisme. Dans les premiers temps de la bactériologie clinique de la listériose, un enrichissement à froid était habituellement réalisé à cette fin, exploitant la capacité de l'organisme à se multiplier aux températures de réfrigération alors que les bactéries de contamination ne peuvent pas se multiplier dans ces conditions. Cependant, cette procédure nécessite des temps d'incubation très longs, souvent des mois ce qui est inacceptable pour les investigations actuelles lors d'épizooties d'origine alimentaire ou de cas sporadiques. Il en est de même pour la mise en place des programmes d'analyse des dangers et d'identification des points critiques en production agro-alimentaire et dans les sites de transformation. Un nombre de composants sélectifs permettant la croissance de *L. monocytogenes* à des températures normales d'incubation ont été ajoutés aux milieux de culture, permettant de raccourcir ainsi le délai nécessaire à la croissance sélective de l'organisme. Ces composants sélectifs sont par exemple : cycloheximide, colistine, cefotetan, fosfomycine, lithium chlorure, acide nalidixique, acriflavine, phényléthanol, céftazidime, polymyxine B et moxalactam. [33]

2.1- Identification bactériologique classique

Listeria est très répandue dans l'environnement, et peut être commensal de l'homme. *L. m.*, seul vrai pathogène, possède les caractéristiques suivantes:

- température de croissance comprise entre 2°C et 45°C. Temps de génération
 - de 13 h à 25 h à 4°C
 - de 5 h à 8 h entre 10 et 13°C
 - de 0,70 h à 35°C.
- pH : de 5,0 à 9,6
- concentration en Na Cl supportée : plus de 10 %
- la pasteurisation détruit *Listeria*. (72°C durant 15 s.)

- la congélation semble sans effet.

A- Enrichissement

L'enrichissement sélectif utilise le bouillon de Frazer. Interviennent comme inhibiteurs l'acide nalidixique, l'acriflavine, le chlorure de lithium et une concentration assez élevée de chlorure de sodium. Deux enrichissements peuvent être faits: - Un enrichissement primaire au jour 0 avec 25 g dans 225 cm³ de bouillon soit une dilution au 1/10.

- Un enrichissement secondaire au jour 1 avec 0,1 cm³ de bouillon d'enrichissement primaire dans 10 cm³ de bouillon soit une dilution au 1/100.

Bouillon de Frazer : Composition pour 1 dm³ (voir annexe 1)

Mode opératoire : (voir annexe 1)

B- Isolement

Les milieux d'isolement utilisés contiennent de nombreux inhibiteurs pour éliminer un maximum des germes présents en grande quantité dans le produit initial. (Fromage, viande, ...). Ces inhibiteurs sont souvent des antibiotiques antibactériens ou antifongiques, ainsi que le chlorure de lithium et l'acriflavine [40]

Gélose OXFORD-CURTIS : Composition finale pour 1 dm³ : (voir annexe 2)

Gélose PALCAM : Composition finale pour 1 dm³ : (voir annexe 2)

Gélose Mox (Gélose OXFORD modifiée au moxalactam) : Composition finale pour 1 dm³ : (voir annexe 2)

Mode opératoire : (voir annexe 2)

C- Identification

L'identification au genre *Listeria* repose sur les caractères morphologiques, sur la recherche de la catalase, sur la mobilité à 25 °C (étudiée en ensemençant deux bouillons nutritifs incubés pendant environ 4 heures, l'un à 25 °C et l'autre à 37 °C ou étudiée en gélose mobilité ce qui permet d'observer l'image caractéristique en

sapin renversé), sur l'hydrolyse de l'esculine (hydrolyse rapide observée en 2 à 3 heures), sur l'acidification du D-glucose, sur une réponse positive aux tests RM et VP et sur l'absence de production d'H₂S. Il est possible de confondre une *Listeria* sp. avec une souche appartenant à un autre genre bactérien:

- Les *Listeria* sp. et les *Enterococcus* sp. cultivent (*Listeria* sp.) ou peuvent cultiver (entérocoques) sur des milieux biliés, sur des milieux hypersalés, sur des milieux à pH 9,6 et réduisent le tellurite de potassium à 0,5 %. De plus, certaines espèces du genre *Enterococcus* sont mobiles et peuvent produire une pseudocatalase et certaines souches de *Listeria* sp. cultivées en bouillon ou observées directement dans un produit pathologique se présentent sous la forme de cellules coccoïdes. Toutefois, la mise en évidence d'une catalase franchement positive, la mobilité à 25 °C et l'immobilité à 37 °C ainsi que la coloration bleu-vert des colonies en transillumination oblique permettent de différencier les *Listeria* sp. des *Enterococcus* sp.
- La distinction entre les *Listeria* sp. et les *Erysipelothrix* sp. repose sur les caractères culturels, la recherche de la catalase, la mobilité, l'hydrolyse de l'esculine et la production d'H₂S.
- *Brochothrix thermosphacta* est une espèce qui, comme les *Listeria* sp., peut être isolée des viandes et des carcasses de volailles réfrigérées et qui peut poser des problèmes de diagnostic différentiel. Toutefois, contrairement aux *Listeria* sp, *Brochothrix thermosphacta* cultive sur le milieu de Gardner, ne cultive pas à 37 °C, ne donne pas des colonies de couleur bleu-vert (observation en transillumination oblique) et c'est une bactérie immobile et n'hydrolysant pas l'hippurate de sodium.
- Certaines espèces du genre *Kurthia* sont également isolées de la viande et des produits carnés et peuvent être confondues avec un représentant du genre *Listeria*. Le diagnostic différentiel est cependant aisé car les *Kurthia* sp. sont aérobies strictes et n'acidifient pas le glucose.

Milieux et galeries d'identification

Milieu TSAYE : bouillon Trypticase-Soja à l'extrait de levure : Composition pour 1 dm³ : (voir annexe 3)

Gélose au sang frais de mouton : La gélose de base est la gélose TSAYE additionnée de 7 % de sang de mouton défibriné. (Voir annexe 3)

Gélose mobilité (SIM) : Composition pour 1 dm³ : (voir annexe 3)

Milieu pour les fermentations : Composition pour 1 dm³ : (voir annexe 3)

Les glucides testés sont : D-xylose, L-rhamnose, Glucose, Maltose et mannitol. Ils sont ajoutés :

- soit sous la forme de disques pré imprégnés.
- soit sous la forme d'une solution de glucide à 5 % en eau distillée stérile et stérilisés par filtration à raison de 1 cm³ de solution de glucide pour 9 cm³ de milieu. (Concentration finale du glucide: 0,5 %).

Milieu pour la recherche de l'uréase : Milieu Urée de Christensen

Milieu pour la recherche de la 3-hydroxy-butanone (VP) et le test de RM : bouillon Clark et Lubs

Milieu pour la recherche de la nitrate réductase : bouillon à l'extrait de viande et peptone additionné de 1 g par dm³ de nitrate de potassium. [40]

V.2.2- Méthodes modernes

V.2.2.1- La méthode "Rapid'L.Mono"

Cette technique utilise un milieu gélosé sélectif permettant une identification en 24-48 heures après l'étape de pré-enrichissement. Le milieu Rapid'L.Mono permet la détection chromogénique d'une phospholipase C produite par *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* et une différenciation de ces deux espèces basées sur la capacité d'acidification du xylose. Vingt cinq grammes d'échantillon sont placés dans 225 mL de bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" et broyés au Stomacher. Le bouillon est incubé 24 heures à 30 °C puis isolé sur gélose Rapid'L.Mono. Un aliquote (0,1 mL) du bouillon Fraser "demi" est ensemencé dans 10 mL de bouillon d'enrichissement Fraser incubé 48 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation le bouillon d'enrichissement Fraser est isolé sur gélose Rapid'L.Mono.

Les milieux gélosés sont incubés à 37 ° C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) sans halo jaune (absence d'acidification du xylose). Les colonies de *Listeria ivanovii* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) entourées d'un halo jaune (acidification du xylose). Les colonies des autres espèces sont blanches (absence de synthèse de phospholipase C), entourées d'un halo jaune (*Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*) ou dépourvues d'un halo jaune (*Listeria grayi*, *Listeria innocua*). [1]

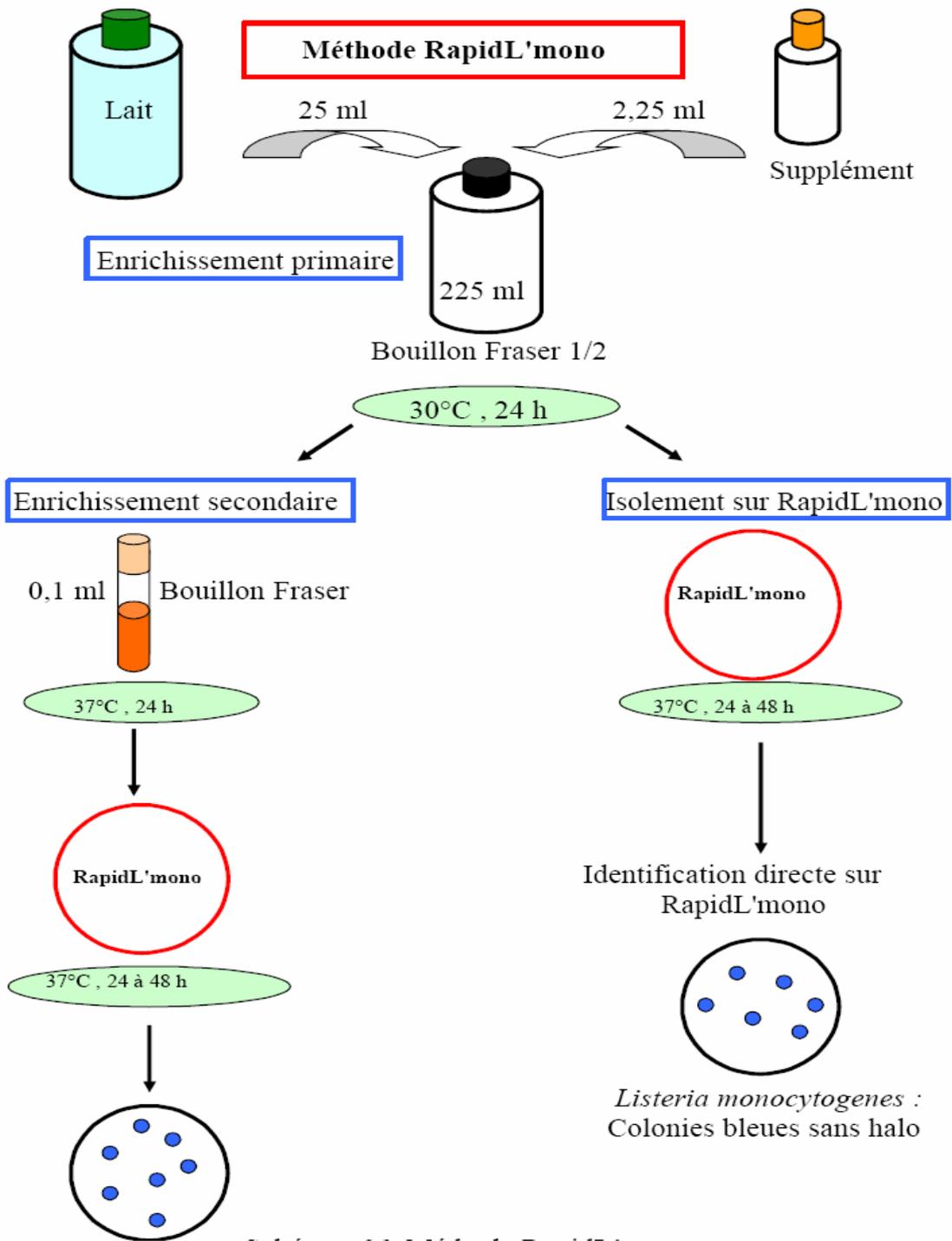


Schéma n° 4 : Méthode RapidL'mono [1]

V.2.2.2- La méthode de routine AFNOR NF V 08 055

La norme **AFNOR V08 055** (déc 1993) est une méthode de routine de recherche de *L. monocytogenes* : détection, identification. Méthode relativement lourde, elle comprend les étapes suivantes :

- enrichissement primaire sur bouillon FRASER au 1/2 (24 h à 30°C)
 - isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
 - enrichissement secondaire sur bouillon FRASER incubé 24 et 48 h à 37°C
 - isolement sur gélose PALCAM ou OXFORD (37°C, 24 ou 48 heures)
 - Les colonies caractéristiques sont identifiées à l'aide de la méthode traditionnelle ou au moyen de galeries miniaturisées (la galerie API 20 STREP est bien adaptée).
- Cette méthode est schématisée ci-dessous :

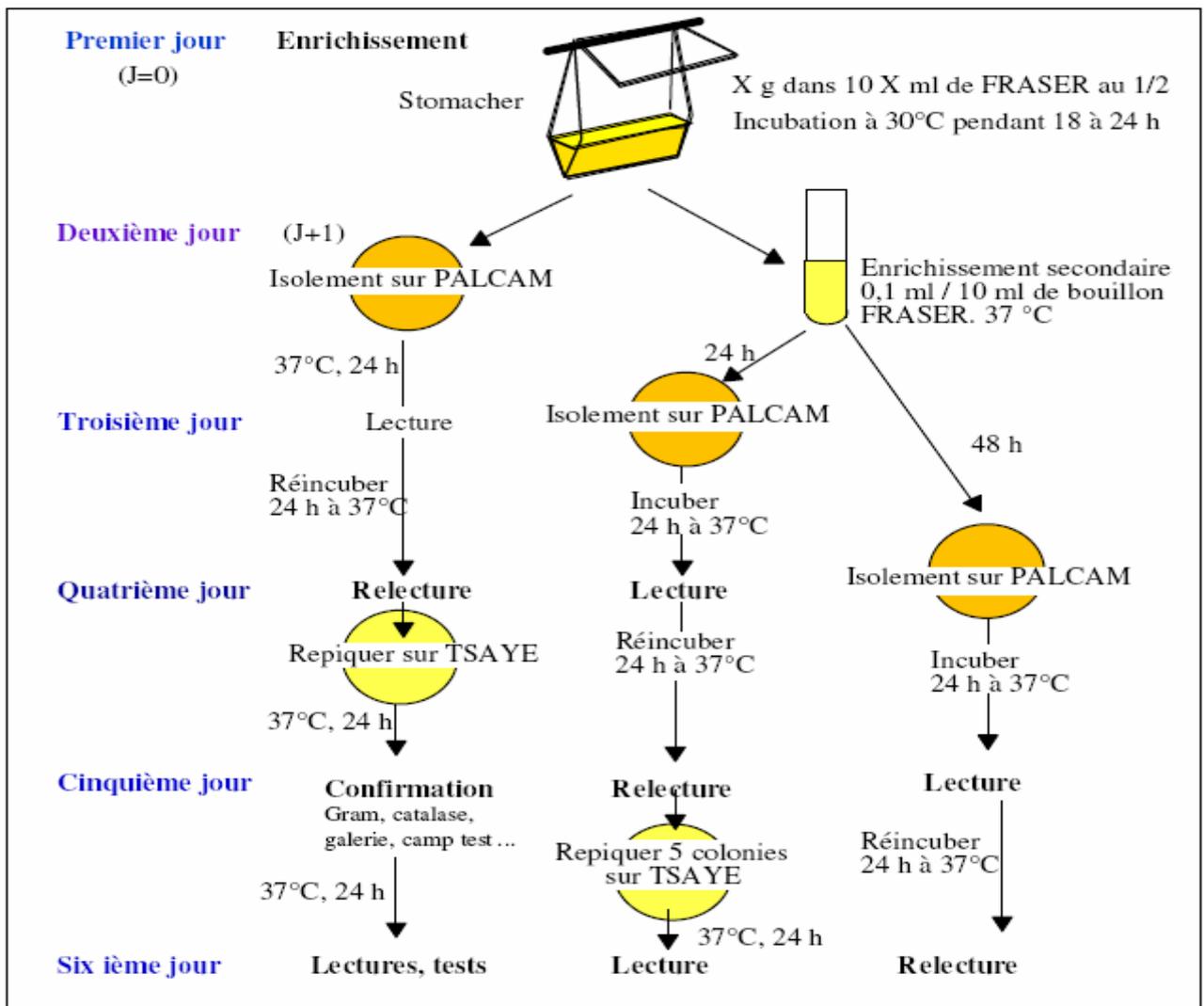


Schéma n°5 : Méthode de routine AFNOR V08 055 déc 1993 (*Listeria monocytogenes*)

V.2.2.3-La méthode normalisée FIL 143 (1990)

Est utilisable pour la recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. Simple à mettre en oeuvre, ses résultats ne sont pas toujours fiables. Elle comprend deux étapes : enrichissement sur bouillon pendant 48 h à 30°C, puis isolement sur gélose OXFORD à 37 ° C pendant 48 h.

V.2.2.4- La méthode normalisée NF EN ISO 11290-1 (février 97) pour la détection

L'échantillon est soumis à un **enrichissement primaire** dans du bouillon FRASER ½ pendant 24 heures à 30° C. L'isolement est réalisé sur milieu PALCALM ou OXFORD. La confirmation *Listeria monocytogenes* est obtenue avec les réponses au milieu TSYEB, l'étude des fermentations des oses, le Camp test, la mise en évidence de l'hémolyse).

V.2.2.5-La méthode normalisée NF EN ISO 11290-2 (août 1998) pour la numération

L'échantillon est soumis à une **revivification** dans du bouillon FRASER ½ sans LiCl ou dans un bouillon peptonné tamponné pendant 1 heure à 20° C. La numération est réalisée sur milieu PALCALM. La confirmation *L. monocytogenes* est obtenue avec les réponses aux milieux TSYEB, fermentations des oses, Camp test, la mise en évidence de l'hémolyse)

2.2.6- La méthode VIDAS® LDUO

Cette méthode s'applique à l'identification rapide de *Listeria monocytogènes* (LM) isolés dans les aliments. Cette méthode peut être appliquée à l'identification présomptive des espèces de *Listeria* dans des bouillons d'enrichissement sélectif de culture. Si des mesures de conformité fondées sur les produits sont prévues, et lorsque stipulé, seule la méthodologie de la DGPSA doit être employée. Elle doit aussi servir à confirmer les colonies trouvées positives par la réaction en chaîne de la polymérase en temps réel (PCR -Polymerase Chain Reaction- temps réel).

Après la procédure d'enrichissement en bouillon sélectif (bouillon Fraser) pour les aliments, ingrédients alimentaires et échantillons environnementaux, le bouillon est soumis à la réaction PCR temps réel qui amplifie une séquence d'ADN spécifique unique à LM. Le système PCR en temps réel par fluorescence utilise des amorces d'oligonucléotides hautement spécifiques à *listeria monocytogenes* et n'amplifient pas l'ADN provenant d'autres organismes non-LM dans les conditions de la réaction. Le fragment d'ADN ainsi amplifié a une masse moléculaire spécifique définie par

les amorces et est facile à identifier par des lectures de fluorescence spécifiques à LM. La procédure complète, après l'étape d'enrichissement sélectif (bouillon Fraser), permet d'identifier en 3 heures les échantillons positifs présumptifs et peut remplacer les tests usuels de dépistage et de confirmation, ce qui constitue une économie considérable de temps, de main d'œuvre et d'argent (en coût d'analyse). Cette technique PCR s'est révélée une méthode spécifique et sensible pour l'identification présumptive des souches de *L. monocytogenes* à partir de divers échantillons.

2.3- Tests d'identification rapide

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

Chapitre VI

Prophylaxie

VI.1- Prophylaxie dans les élevages

VI.2- Prophylaxie dans les industries

VI.3- Prophylaxie chez l'homme

VI.4- Développement de *listeria monocytogenes* dans les aliments

VI.5- Législation

Prophylaxie

La prophylaxie des infections à *Listeria* et notamment des anadémies de listériose humaine est avant tout une prophylaxie sanitaire qui nécessite un contrôle de tous les échelons de la filière agro-alimentaire. Cette prévention est toutefois très délicate car les *Listeria* sp. sont des germes ubiquistes dont l'éradication est illusoire.

De plus, la détection des denrées alimentaires contaminées ne peut résoudre tous les problèmes. En effet, après fabrication d'un aliment, la présence d'une seule cellule dans un produit apte à assurer sa multiplication représente un danger potentiel pour un consommateur fragile. Pour déceler 0,1% de produits contaminés avec un taux de réussite de 95 %, il faudrait analyser 2000 produits. Dans ces conditions, un industriel ne peut certifier que ses denrées alimentaires sont totalement exemptes de *Listeria monocytogenes*. [1]

La prophylaxie médicale (vaccination et/ou antibioprophylaxie) n'est pas utilisée.

VI.1- Prophylaxie dans les élevages

Dans les élevages, plusieurs points forts sont à maîtriser :

- l'animal lui-même : 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.
- 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.
- 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*
- Le lait stocké à la ferme doit être conservé à une température ne dépassant pas 4 ° C et une recherche systématique de *Listeria* sp. doit être entreprise en vue de détecter les vaches excrétrices. Cette recherche peut s'effectuer avec un rythme annuel ou semestriel et être réalisée à l'échelon individuel ou, pour

les grands effectifs, sur des échantillons successifs de taille de plus en plus réduite. La réforme des femelles excrétrices est une nécessité.

VI.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 sont favorisées 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 *L.m.* Par conséquent, la prophylaxie de la listériose sera fondée sur :

1. la sélection rigoureuse des matières premières,
2. le strict respect des plans de nettoyage et de désinfection,
3. 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.

En revanche, la pasteurisation du lait (72 ° C pendant 15 secondes) est considérée comme efficace si elle est correctement effectuée (nettoyage et désinfection régulières des pasteurisateurs, vérification des réglages, surveillance de l'opération)

4. 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.

5. 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.

6. Le traitement antimicrobien des matières premières (ionisation, irradiation, système lactoperoxydase, utilisation d'antimicrobiens biologiques, traitement par des acides organiques tels que l'acide lactique, l'acide citrique ou l'acide acétique...) a fait l'objet de très nombreux travaux. C'est notamment le cas de l'utilisation de bactériocines produites par des bactéries lactiques (*Carnobacterium* sp, *Lactobacillus* sp. *Leuconostoc* sp. *Pediococcus* sp. ...).

VI.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.

La médecine du travail 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.

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*.

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. [26]

VI.4- Développement de *L. monocytogenes* dans les aliments

Il y a des études qui montrent que l'on peut prévoir que tout aliment qui n'a pas été soumis à un traitement thermique adéquat dans l'emballage final subira à un moment ou un autre une certaine contamination par *L. monocytogenes*. Il est donc nécessaire d'empêcher que la quantité de ces bactéries atteigne un niveau dangereux.

Le taux de croissance de *L. monocytogenes* ralentit avec l'abaissement de la température : le tableau n°10 indique le temps nécessaire pour que le nombre de cellules passe de 10 à 100 par gramme pour une souche courante (les taux peuvent varier de 1 à 4 d'une souche à l'autre).

Temps approximatif nécessaire à une population de *L. monocytogenes* de souche courante pour passer de 10 à 100 cellules en fonction de la température, du pH et de la teneur en sel (d'après Food MicroModel) [17]

PH	Teneur en sel	1° C	3° C	5° C	8° C	10° C
6.0	1%	375 h	230 h	145 h	78 h	53 h
5.0	1%	919 h		352 h		127 h
6.0	3%	596 h		234 h		87 h

Ce tableau illustre que plus la température est basse, plus le taux de multiplication est faible : avec un pH de 6,0 et 1 % de sel (NaCl), le nombre de cellules passe de 10 à 100 en 3 jours environ à 8°C, tandis que 10 jours sont nécessaires à 3°C. Afin de réduire le risque de listériose comme le risque de développement (ou de formation de toxines) d'autres organismes pathogènes, il est impératif de maintenir la température des aliments réfrigérés aussi basse que possible lors de l'entreposage et des différentes étapes de distribution jusqu'aux points de vente. Des températures basses atténuent aussi la dégradation de la qualité et peuvent permettre d'allonger la durée de conservation.

On peut empêcher le développement de *L. monocytogenes*, ou au moins le réduire, par d'autres moyens, par exemple en réduisant le pH ou en augmentant la teneur en sel. Le tableau montre que :

- pour un aliment contenant 3 % de sel au lieu de 1 %, et un pH également de 6,0, le temps nécessaire pour passer de 10 à 100 cellules est accru de plus de 50 % ;
- pour un aliment de pH 5,0 au lieu de 6,0, contenant 1 % de sel, le temps nécessaire pour passer de 10 à 100 cellules est plus que doublé.

On peut aussi améliorer la sécurité alimentaire en changeant la formule du produit d'autres manières, comme par adjonction de nitrite, lactate, etc. Ainsi le système d'"Analyse multi barrières" permet de minimiser le risque de développement de *L. monocytogenes* comme d'autres pathogènes. L'utilisation de bonnes pratiques d'hygiène à tout instant en fabrication alimentaire est essentielle ; la mise en oeuvre de systèmes de HACCP bien conçus sur les sites de transformation alimentaire augmente la sécurité des aliments.

Les problèmes rencontrés avec *L. monocytogenes* dans les pays industrialisés peuvent s'expliquer par l'extension des produits préparés, qui favorisent leur développement par l'allongement de la durée de conservation sous froid, et permettent la consommation sans cuisson complémentaire. Dans certains cas, ces aliments se révèlent contaminés par des populations relativement importantes de cet organisme, parfois plus de 1000 CFU/g.

VI.5- Législation

Plusieurs pays ont choisi un système de "tolérance nulle" pour la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments, se fondant sur la gravité de la listériose et sur le fait que l'on ne connaît pas la dose minimale infectieuse. Cette approche signifie que l'organisme doit être totalement absent des aliments "prêts à consommer".

Plusieurs pays fixent à 100 cfu/g le niveau de tolérance de *L. monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer, en ramenant à zéro la tolérance pour les aliments ayant subi un traitement thermique à l'emballage final.

Il faut comprendre qu'il est extrêmement difficile d'assurer la totale absence de *L. monocytogenes* dans les aliments. Mais si les pays ayant une approche réglementaire plus stricte doivent être convaincus qu'un niveau de tolérance plus élevé est acceptable, les pays qui ont adopté une tolérance plus grande, par exemple 100 cfu /g, doivent faire la preuve que leur approche garantit la sécurité. Ceci nécessitera un diagnostic et un recensement plus précis des intoxications alimentaires, qui à leur tour nécessiteront de meilleures techniques microbiologiques. [17]

Le Règlement" 2073/2005 relatifs aux critères microbiologiques se base sur cette particularité et définit les deux catégories suivantes :

- Les denrées alimentaires prêtes à être consommées, permettant le développement de *L. monocytogenes* (autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales) pour lesquels la norme est de 100 ufc/g (unités formant colonies par gramme) pour les produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation et absence dans 25 g avant que la denrée alimentaire n'ait quitté le contrôle immédiat de l'opérateur qui l'a fabriquée.
- Les denrées alimentaires prêtes à être consommées ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes* (autres que celles destinées aux nourrissons ou à des fins médicales spéciales) pour lesquels la norme est de 100 ufc/g pour les produits mis sur le marché pendant leur durée de conservation.

Le développement des bactéries dépend de l'acidité du produit (le pH) et de la quantité d'eau disponible pour le développement des bactéries. L'eau disponible est caractérisée par la notion d'activité de l'eau (a_w) et varie entre 0 et 1. La diminution du pH et de l' a_w permet de ralentir la multiplication de la bactérie, voir de l'arrêter. Le nouveau règlement définit que les produits pour lesquels le pH est inférieur à 4,4 ou l' a_w est inférieure à 0,92 et les produits pour lesquels le pH est inférieur à 5 et l' a_w est inférieure à 0,94 sont considérés comme des denrées ne permettant pas le développement de *Listeria monocytogenes*. Les produits à durée de conservation inférieure à cinq jours appartiennent également automatiquement à la deuxième catégorie. [38]

Partie Pratique

I. les cas de listériose dans le monde

La listériose est une infection rare bien qu'elle reste toujours redoutable puisque le nombre de victimes dans le monde est très élevé. Comme le montre le tableau n° 10

Tableau N° 10 : Exemples de Listérioses déclarées dans le monde

Pays, année	Nombre de cas	Aliment
Canada en 1981	41 cas dont 17 morts	Salade de choux Conservée à 4°C
Boston en 1983	49 personnes dont 14 morts	lait pasteurisé
Philadelphie en 1987	32 cas dont 11 morts	-- ?
Suisse en 1983-1987	122 cas dont 34 morts	Fromage à pâte molle
Finlande en 1988	01 cas	Champignon salé
France en 1992	279 cas dont 63 morts	Charcuterie à base de langue de porc
France en 1993	39 cas	Rillettes de porc
Australie en 1991	02 cas	Moules fumées
USA en 1994	48 cas	Lait au chocolat
USA en 1998	100 cas dont 20 morts	Saucisse type hot-dog

Et selon les données épidémiologiques émanant du Centers for Disease Control and Prévention (CDC) d'Atlanta, les estimations actuelles indiquent que chaque année aux USA, la listériose touche 1100 personnes dont 250 (soit 25 %) décèdent en conséquence

II. présence de la listéria en Algérie

II.1. Le Centre Algérien de Contrôle de la Qualité et de l'Emballage

Le Centre Algérien de Contrôle de la Qualité et de l'Emballage a fait une étude sur l'évaluation du niveau de *Listeria monocytogenes* dans les aliments et autres produits de l'environnement en Algérie ; Cette étude est la première dans son genre en Algérie

II.1.1. Prélèvement des échantillons

Plusieurs prélèvements d'échantillons, issus de différentes régions du pays : l'Est, l'Ouest, et le Centre, ont été effectués. Les prélèvements sont réalisés dans les régions où sont implantés les laboratoires du CACQE qui ont participé aux travaux de recherche liés à *Listeria monocytogenes* (Fig.1).

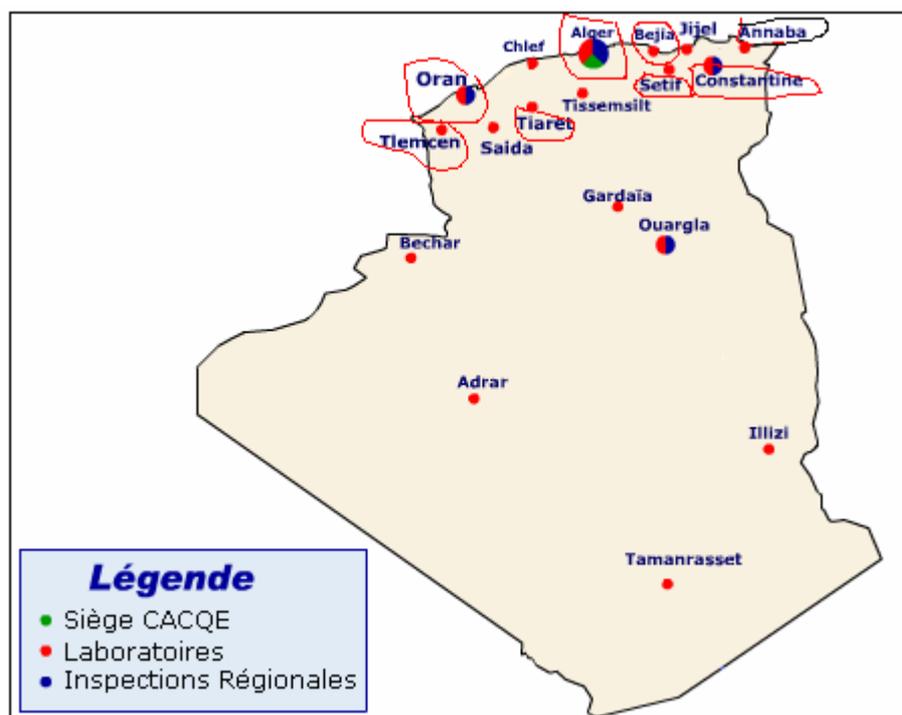


Figure 3 : Répartition géographique des laboratoires du CACQE (encadrés) ayant participé à l'étude de recherche de *Listeria*

II.1.2. Méthodes utilisées pour la recherche et identification de *Listeria monocytogenes*

Les méthodes de détection de *L. monocytogenes* ont beaucoup évolué ces dernières années: Les méthodes alternatives dont le principe est basé, sur une réaction immunoenzymatique ou utilisant des sondes nucléiques, sont actuellement commercialisées sous forme de kits prêts à l'emploi et donnent des résultats satisfaisants.

Les méthodes d'analyses mises en œuvre dans nos travaux sont :

- La méthode alternative Rapid L –mono, validée par AFNOR
- La méthode normalisée ISO 11290-1 : Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

II.1.3. Résultats et Discussion

A. Résultats de la recherche de *Listeria monocytogenes* par la méthode alternative Rapid L- mono

Tableau N°11 : Echantillons analysés par méthode Rapid L-mono

Aliment	Nombre des Echantillons	Présence de listéria
Lait cru	14	--
Fromage	21	--
Cachir	05	--
Merguez	12	01
Poulet entier réfrigéré	01	--
TOTAL	54	01

Parmi les 54 échantillons analysés par la méthode Rapid L-mono, seul un échantillon de merguez a présenté un résultat positif

B. Résultats des analyses par la Méthode normalisée ISO 11290-1

Tableau N°12: Résultats de la suspicion de présence de Listéria selon les types d'aliments

Aliments	Nombre des Échantillons	Présence suspecte de Listéria
Laits crus et autres	229	16
Yaourt	07	--
Fromage	66	05
Crème glacée	39	--
Beurre	05	--
Cachir	25	--
Merguez	44	04
Pâté	03	--
Plat carné	02	--
Viande hachée	02	--
Plat cuisiné	03	--
Pâtisserie	22	--
Aliment de bétail	15	01
Aliment de poulet	03	--
Fumier	04	01
Crotte de cheval	03	--
Total	472	27

Sur les 472 échantillons analysés par la méthode ISO 11290-1, ils ont suspecté un nombre d'échantillons (27) pouvant contenir le genre listéria, Cependant, avec l'utilisation d'une galerie biochimique spécialement conçue pour les espèces Listeria (API Listeria) ils ont infirmé sa présence dans tous les échantillons analysés par la méthode ISO 11290-1.

III. Coût et tarif des méthodes rapides pour la recherche et identification de la listeria monocytogenes

Tableau N°14 : Tarif 2007-2008 en Euros pour la recherche et l'identification de listéria [44]

Listéria	Tarif 2007-2008 H.T. en Euros
Listeria (recherche + dénombrement simultanés) DGAL/SDHA/N93.8108	55.33
Listeria recherché - NF EN ISO 11290-1	47.33
Forfait Listeria méthode validée gélose rapid'L. mono - AFNOR BRD 07/4 - 09/98	23.38
Listeria identification NF EN ISO 11290-1	23.59
Listeria numération < 10/g - NF EN ISO 11290-2 ou BRD 07/05-09/01	25.29
Listeria numération <100/g - NF EN ISO 11290-2 ou BRD 07/05-09/01	10.63

Conclusion

Conclusion

Les résultats obtenus sont très intéressants dans la mesure où quelle que soit la méthode d'analyse nous avons observé la présence de *Listeria*.

Ces résultats démontrent :

- Il y a des cas de listériose dans notre pays ;
- Présence de la *Listeria* dans notre alimentation ;
- Que nous sommes quotidiennement exposés au risque d'héberger *L. monocytogenes* par ingestion d'aliments contaminés ;

Les analyses concernant la recherche et l'identification de *L. monocytogenes* n'est pas appliquée en Algérie, ce qui est peut être dû :

- Aux manques de matériel, milieux de culture et le manque d'expérience ;
- Les nouvelles méthodes sont très coûteuses mais elles donnent des résultats rapides à l'encontre des méthodes classiques prennent énormément de temps ;

Pour une meilleure prise en charge des problèmes d'hygiène alimentaire provoqués par la *Listeria*, il est temps aujourd'hui de :

- Protéger la santé des consommateurs, par la mise en place d'un protocole de contrôle des produits alimentaires à leur sortie des usines ;
- Améliorer la gestion de la qualité des produits mis à la consommation ;
- Compte tenu de l'ubiquité de *Listeria monocytogenes*, il est techniquement impossible de garantir l'absence totale de ce germe dans les aliments, il faut imposer une stratégie rigoureuse pour les règles d'hygiène (le système HACCP) des ateliers de production excepté ceux ayant subi un traitement bactéricide pendant leur emballage final ;
- Mettre en place un système d'information pour les consommateurs – notamment ceux à risque (femmes enceintes par exemple) ;
- Mettre en application la réglementation algérienne (Arrêté Interministériel du 24 janvier 1998 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires).

Il est donc temps, de redoubler de vigilance en mettant en place dès à présent, une réglementation adéquate suivie et contrôlée ainsi qu'une bonne communication sur les risques en vue de sensibiliser au mieux la population.

Références bibliographiques

- [1] <http://www.sante.dz/ipa/Lebres.pdf>
- [2] <http://www.microbes-edu.org/etudiant/listeriam.html>
- [3] <http://www.fph.ch/fr/qui-sommes-nous/notions-cle/securite-alimentaire.html>
- [4] <http://www.agrojob.com/dictionnaire/definition-SECURITE-ALIMENTAIRE-2372.htm>
- [5] http://pastel.paristech.org/1258/01/M%C3%A9moire_Th%C3%A8se_BL_Final.pdf
- [6] http://www.humanite.fr/1993-09-14_Articles_-Des-souches-de-listeria-dans-les-rillettes-Tradilege
- [7] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/ll/listeria.html>
- [8] <http://www.bacteriologie.net/medicale/listeria.html>
- [9] http://diffusiondessavoirs.uomlr.fr/balado/wp-content/uploads/2007/10/analyses_-biologiques.pdf
- [10] http://pedagogie.ac-toulouse.fr/biotech-sante-envir/documentation/paquet_hygiene/evolution_reglementation_criteres_microbiologiques_DGCCRF.pdf
- [11] <http://www.microbes-edu.org/etudiant/listeriam.html>
- [12] <http://www.affairesjs.com/corynebacterium.htm>
- [13] http://www.iph.fgov.be/ClinBiol/bckb33/activities/external_quality/rapports/_do wn/microbiologie/2001/3F_MICROBIO.pdf
- [14] http://www.google.com/search?q=caract%C3%A9res+biochimiques%2Blisteria&hl=fr&lr=lang_fr&start=20&sa=N
- [15] <http://pagesperso-orange.fr/francois.dart/pagbac/listeria/listreg.htm>
- [16] http://www.invs.sante.fr/BEh/2004/09/beh_09_2004.pdf
- [17] <http://www.iifiir.org/fr/doc/1008.pdf>
- [18] <http://www.microbe-edu.org/etudiant/listeriam.html>
- [19] <http://etudiant.vet-alfort.fr/pedago/theses/ovins/htm/bacterienne/listeriose.htm>
- [20] <http://www.gds38.asso.fr/web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/b8f30bc24984ce58c125728f006c12ad!OpenDocument>
- [21] <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=1007776>
- [22] <http://www.isciences.fr/pdf/listeria.pdf>
- [23] <https://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/Listeriose.html>
- [24] <http://www.iifiir.org/fr/doc/1008.pdf>
- [25] <http://www.fromag.com/pratique/laitcru.html>

- [26] <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/l/listeria.html>
- [27] <http://pagesperso-orange.fr/francois.dart/pagbac/listeria/listcarn.htm>
- [28] <http://pagesperso-orange.fr/francois.dart/pagbac/listeria/listmer.htm>
- [29] <http://www.ifremer.fr/bibliomer/consult.php?ID=1993-0192>
- [30] <http://pagesperso-orange.fr/francois.dart/pagbac/listeria/listvola.htm>
- [31] <http://pagesperso-orange.fr/francois.dart/pagbac/listeria/listveg.htm>
- [32] <http://www.gds38.asso.fr/web/gds.nsf/8cb279f7ace047aac1256c0f004cf0d5/b8f30bc24984ce58c125728f006c12ad!OpenDocument>
- [33] http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/pdf_fr/Chapitre%20final05%202.10.14_Listeria.pdf
- [34] <http://www.fao.org/docrep/008/y5393f/y5393f06.htm>
- [35] <http://www.fao.org/docrep/008/y5393f/y5393f07.htm>
- [36] <http://www.fao.org/docrep/008/y5393f/y5393f09.htm>
- [37] <http://www.fao.org/docrep/008/y5393f/y5393f11.htm>
- [38] <http://www.cqpf.be/pdf/publications/cqpf2.pdf>
- [39] http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/officiels/afssa/Listeria090207.pdf
- [40] Yves DACOSTA ; octobre 1995 ; Effets comparés des divers modes de conditionnement sur la croissance des bactéries pathogènes responsable des intoxication alimentaires
- [41] <http://www.cqpf.be/pdf/publications/cqpf2.pdf>
- [42] http://www.cg-aube.com/medias/documents/20_1021.pdf
- [43] http://www.klekoon.com/boamp/BOAMP_3_Detail.asp?ID_appel=705629
- [44] http://www.adilva.com/site_docs/Adilva/Journees2006/ADILVA_2006Oct26_Rapid%20_%20L.mono24heures.pdf
- [45] <http://www.transfert.net/Du-silicium-contre-la-Listeria>
- [46] <http://www.asept.fr/pages/autres-documents/catE9gories-daliments-et-listeria-monocytogenes.php>

Annexes

Annexe 1

A- Enrichissement

Bouillon de Frazer : Composition pour 1 dm³

- polypeptone 10,0 g
- extrait de levure 5,0 g
- extrait de viande 5,0 g esculine 1,0 g
- citrate de fer III ammoniacal 0,5 g
- chlorure de lithium 3,0 g
- acide nalidixique 0,02 g
- acriflavine (chlorhydrate) 0,025 g
- chlorure de sodium 20,0 g
- hydrogénophosphate de sodium 9,6 g
- dihydrogénophosphate de potassium 1,3 g
- pH =7,1

Mode opératoire : La prise d'essai de 25 g est placée dans 225 cm³ de bouillon de Frazer, puis incubée à 30°C durant 24 heures.

Annexe 2

B- Isolement

Gélose OXFORD-CURTIS : Composition finale pour 1 dm³ :

- mélange spécial de peptones 23,0 g
- amidon de maïs 1,0 g
- esculine 1,0 g
- citrate de fer III ammoniacal 0,50 g
- *acriflavine chlorhydrate* 0,005 g
- *cefotetan* 0,002 g
- *colistine sulfate* 0,02 g
- *cycloheximide* 0,4 g
- *fosfomycine* 0,01 g
- *éthanol* 5,0 mL
- chlorure de lithium 15,00 g
- chlorure de sodium 5,00 g
- agar 15,0 g
- pH = 7,2

Sur ce milieu les colonies de *Listeria* apparaissent au bout de 24 heures sous forme de colonies grises ou gris verdâtre luisantes, de 1 mm de diamètre environ, entourées d'un halo brun noir. Après 48 heures, le diamètre devient de 2 mm, les colonies sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale.

Gélose PALCAM : Composition finale pour 1 dm³ :

- mélange spécial de peptones 23,0 g
- amidon de maïs 1,0 g
- glucose 0,50 g
- mannitol 10,0 g
- esculine 0,80 g
- citrate de fer III ammoniacal 0,50 g
- *acriflavine chlorhydrate* 0,005 g
- *ceftazidime* 0,02 g
- *polymyxine B sulfate* 0,01 g
- rouge de phénol 0,09 g
- chlorure de lithium 15,00 g
- chlorure de sodium 5,00 g
- agar 15,0 g
- pH = 7,2

Sur ce milieu les colonies de *Listeria* ont le même aspect que sur gélose OXFORD mais sont verdâtres.

Gélose Mox (Gélose OXFORD modifiée au moxalactam) : Composition finale pour 1 dm³ :

- gélose Columbia modifiée 38,1 g
- esculine 1,0 g
- citrate de fer III ammoniacal 0,50 g
- colistine 0,01 g
- *moxalactam* 0,02 g
- chlorure de lithium 15,00 g
- pH = 7,2

Sur ce milieu les colonies de *Listeria* ont le même aspect que sur gélose OXFORD.

Mode opératoire : Le 3^o jour, soit après 24 heures d'incubation des bouillons d'enrichissement, quatre isolements sont réalisés :

- deux à partir du bouillon RV sur deux milieux sélectifs
- deux à partir du bouillon sélénite cystine sur deux milieux sélectifs

Ils sont incubés à 35-37° C. Le 4^o jour, soit après 48 heures d'incubation des bouillons d'enrichissement, les opérations décrites ci-dessus sont répétées.

Annexe 3

C. Identification

Milieu TSAYE : bouillon Trypticase-Soja à l'extrait de levure : Composition pour 1 dm³ :

- trypticase 17,0 g
- Soytone 3,0 g
- extrait de levure 6,0 g
- chlorure de sodium 5,0 g
- agar 15 g
- pH = 7,3

Gélose au sang frais de mouton : La gélose de base est la gélose TSAYE additionnée de 7 % de sang de mouton défibriné.

Gélose mobilité (SIM) : Composition pour 1 dm³ :

- extrait de viande 3,0 g
- extrait de levure 6 g
- chlorure de sodium 5 g
- agar 4,5 g
- pH = 7,4

Milieu pour les fermentations : Composition pour 1 dm³ :

- gélysate 10,0 g
- chlorure de sodium 5,0 g
- bromocrésol pourpre 0,02 g
- pH = 6,8

Les glucides testés sont : D-xylose, L-rhamnose, Glucose, Maltose et mannitol. Ils sont ajoutés: - soit sous la forme de disques pré imprégnés.

- soit sous la forme d'une solution de glucide à 5 % en eau distillée stérile et stérilisés par filtration à raison de 1 cm³ de solution de glucide pour 9 cm³ de milieu. (Concentration finale du glucide: 0,5 %).

Milieu pour la recherche de l'uréase : Milieu Urée de Christensen

Milieu pour la recherche de la 3-hydroxy-butanone (VP) et le test de RM : bouillon Clark et Lubs

Milieu pour la recherche de la nitrate réductase : bouillon à l'extrait de viande et peptone additionné de 1 g par dm³ de nitrate de potassium