

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

Université Mentouri-Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Biochimie – Microbiologie

N° d'ordre :

Série :

Thèse de Doctorat Es Sciences

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

Analyse et prévalence du risque infectieux de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus récoltés dans deux régions à climat différent (zone semi-aride et le Nord-Est algérien) :
Modélisation spatiale de la diversité floristique

Présenté par :

BOUBENDIR Abdelhafid

Devant le jury :

BENGUEDOUAR	Ammar	Président	Professeur	Université Mentouri-Constantine
HAMIDECHI	M. Abdelhafid	Rapporteur	Maître de Conférences	Université Mentouri-Constantine
AOUN	Leila	Examinatrice	Maître de Conférences	Centre Universitaire El-Tarf
DARBOUCHE	Abdelhak	Examineur	Maître de Conférences	Université Khenchela
ARHAB	Rabah	Examineur	Maître de Conférences	Université Tébessa

Année Universitaire 2011/2012

Dédicaces

Je dédie ce travail à :

A mon père, ma mère et ma femme.

A ma grand-mère et mon grand-père.

A mes frères et sœurs : Rahima, Amine, Sabrina, Abdelouahed,
Abdelkarim, Reda et Akram.

A mes filles : Sirine et Fatima Zohra.

A toute ma famille.

A tous mes amis.

Aux étudiants de "Contrôle de Qualité et Analyses" de l'Université de
Biskra.

A Monsieur CHALA A. le vice-président de l'Université de Biskra.

A Monsieur MELKEMI K., TERESSA A., BENATTIA, ABED, TAKLIT A.
et LADRAA M.

A la mémoire de mon ami Samir MANSOURI qui m'accompagné lors de
mes sorties de prélèvements.

A tous ceux qui veulent servir la science et l'Algérie.

Je dis à tous :

«Le difficile est ce qui peut être fait tous de suite, l'impossible est se qui
demande un peu plus de temps»

Remerciements

Je remercie, en premier lieu, le grand **Dieu** pour m'avoir donné la force et la résolution pour réaliser ce travail.

Je remercie vivement :

* Monsieur **HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid**, Docteur Microbiologiste au Département de Biochimie Microbiologie à l'Université Mentouri-Constantine, pour avoir accepté de m'encadrer et me diriger. Je le remercie également pour ces précieux conseils, son grand sens d'humanisme, sa grande générosité et sa grande volonté à me suivre le long de ce travail.

* Le Professeur **BENGUEDOUAR Ammar**, enseignant Professeur au Département de Biochimie Microbiologie à l'Université de Mentouri-Constantine pour avoir accepté de présider le jury et pour avoir beaucoup consacré de son précieux temps. Le Professeur **BENGUEDOUAR Ammar** est connu au sein de la communauté universitaire par sa parfaite organisation ; qu'il trouve à travers ce travail toute l'expression de remerciements de son étudiant respectueux et dévoué.

* Le Docteur **AOUN Leila**, enseignante en sciences vétérinaires au Centre Universitaire d'El-Tarf, pour avoir accepté de juger ce travail et pour son déplacement jusqu'à Constantine, tenant compte des ses charges pédagogiques et toutes ses responsabilités et activités scientifiques qu'elle assure à l'Institut des sciences vétérinaires au Centre Universitaire d'El-Tarf. Que le Docteur **AOUN Leila** Trouve, à travers cette invitation au jury, toute l'expression du meilleur respect et l'honneur que nous lui témoignons.

* Le Docteur **DARBOUCHE Abdelhak**, enseignant microbiologiste à l'Université de Khenchela, pour avoir accepté de juger ce travail. Monsieur **DARBOUCHE Abdelhak** est un spécialiste des *Listeria* au vue de ses travaux de recherches réalisés en Allemagne et en Algérie; qu'il trouve ici un grand plaisir à examiner cette thèse avec tous nos meilleurs remerciements.

* Le Docteur **ARHAB Rabah**, enseignant microbiologiste à l'Université de Tébessa, pour avoir accepté de juger ce travail. Le profil largement varié du Docteur **ARHAB Rabah** en microbiologie, en Biotechnologie et en Biochimie microbienne va apporter, sans doute, un plus à cette thèse ; nous vous adressons toute l'expression de notre profond respect.

Le professeur Saad IBNSOUDA KORAICHI, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdullah (U.S.M.B.A), Fès, Maroc, ainsi que Mohamed MOSTAKIM, Soumya EL ABED pour leur aide précieuse, hospitalité et contribution scientifique dans la réalisation de ce travail.

Les Docteurs vétérinaires pour avoir eu la grande amabilité de se déplacer avec nous aux niveau des différentes fermes d'élevage bovin pour examiner les vaches et pour réaliser les prélèvements de lait cru. Tout le personnel du Département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Khider (Biskra,) ainsi que tout l'encadrement administratif de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie, pour avoir assuré le cadre agréable à l'évolution de mon travail de recherche. Tout le personnel du laboratoire d'hygiène de Mila pour m'avoir accueilli et soutenu durant mes travaux dans la région de Mila.

Résumé

Au cours de notre étude, un total de 104 échantillons de lait collectés à partir de 60 bovins laitiers dans six fermes à Mila et à Biskra, ont été examinés pour la présence de *Listeria spp.* et autres bactéries psychrotrophes. L'isolement a été réalisé par stockage à froid des échantillons de lait suivi d'une culture sur gélose au sang additionnée de Cefazoline. Les isolats ont été identifiés phénotypiquement par l'étude des caractères culturels, morphologiques, biochimiques; et génétiquement en utilisant le gène ARNr 16S. Les genres bactériens psychrotrophes isolés regroupent à la fois, les Gram négatif "*Acinetobacter spp., Aeromonas spp., Pseudomonas spp., Stenotrophomonas spp., Proteus spp., Yersinia spp., Klebsiella spp., Alcaligenes spp., et Flavobacterium spp.*" et les Gram positif "*Enterococcus spp., Listeria spp., Staphylococcus spp., et Bacillus spp.*". *Enterococcus spp.* est le genre dominant durant les différentes saisons, alors que la contamination du lait par *Listeria spp.* est plutôt saisonnière. Son incidence était positive en hiver et au printemps, alors qu'elle était absente en été et en automne.

Mots clés : Incidence - *Listeria spp.* - lait cru.

Abstract

In this study a total of 104 milk samples collected from 60 dairy cattle in six farms in the North East in Mila and Semi arid in Biskra, were examined for the presence of *Listeria spp.* and other psychrotrophic bacteria. The isolation was accomplished by cold storage of milk samples followed by plating on blood agar added of Cefazoline. The isolates were identified phenotypically by studying cultural, morphological, biochemical criteria; and genotypically using the 16S rRNA gene. Psychrotrophic bacteria from numerous genera have been isolated, both gram negative "*Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Alcaligenes spp.*, and *Flavobacterium spp.*" and gram positive "*Enterococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, and *Bacillus spp.*". *Enterococcus spp.* was the dominant genera in different seasons. Milk contamination by *Listeria spp.* was seasonal, its incidence was positive in winter and in spring, however it was absent in summer and autumn.

Keywords: Incidence - *Listeria spp.* - raw milk.

ملخص

في دراستنا جمعت 104 عينة حليب من 60 بقرة حلوب في ستة مزارع موجودة في الشمال الشرقي بميلة والشبه الجاف ببسكرة , وتم اختبار وجود *Listeria spp.* وبكتيريا أخرى محبة للبرودة . أنجز العزل عن طريق التخزين في البرد للعينات متنوع بالزرع في وسط صلب مضاف بالدم وCefazoline. تم التعرف على العزلات عن طريق دراسة الخصائص الظاهرة الزراعية, الشكلية, الكيمائية الحيوية و الخصائص الوراثية باستعمال المورثة ARNr 16S. كانت الأجناس المحبة للبرودة المعزولة متنوعة و كانت تشمل ذوات الغرام السالب *Acinetobacter spp., Aeromonas spp., Pseudomonas spp., Stenotrophomonas* و الغرام الموجب *Flavobacterium spp., Proteus spp., Yersinia spp., Klebsiella spp., Alcaligenes spp., Enterococcus spp.* كان الجنس *Bacillus spp. و Staphylococcus spp., Enterococcus spp., Listeria spp.* السائد طول الفصول, بينما كان تلوث الحليب بـ *Listeria spp* فصلي و كان موجود في الشتاء و الربيع و غائب في الصيف و الخريف.

كلمات المفاتيح: تواجد , *Listeria spp.* , محبة للبرودة , حليب طازج.

LISTE DES FIGURES

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Les principaux germes constituant le microbiote du lait cru (Guiraud, 1998).	6
Figure 2	Evolution de la taxonomie des <i>Listeria</i> (Bind, 1990)	12
Figure 3	Clé dichotomique pour l'identification des <i>Listeria spp.</i> (Gorski, 2008)	17
Figure 4	Contamination et transmission de <i>Listeria</i> dans le lait.	30
Figure 5	Représentation circulaire du génome de <i>L. welshimeri</i> (Hain <i>et al.</i> , 2006).	35
Figure 6	Organisation génétique et fonctions prédictives de pLM5578 (A) et l'îlot génomique 1 de <i>Listeria</i> (LGI1) (B) (Gilmour <i>et al.</i> , 2010).	36
Figure 7	Diagramme schématique du cluster de virulence (<i>vcl</i>) (Schmid <i>et al.</i> , 2005).	38
Figure 8	Représentation schématique de l'InlA (Cabanes, 2004).	38
Figure 9	Schéma des principaux gènes de virulence de <i>L. monocytogenes</i> régulés par PrfA (Schmid, 2005).	40
Figure 10	Mécanisme de l'invasion cellulaire par <i>Listeria spp.</i>	40
Figure 11	L'arbre de la composante phylogénétique de <i>Listeria</i> basé sur l'analyse comparative des séquences des ADNr 16S. La barre indique 10% de séquence divergente (Schmid <i>et al.</i> , 2005).	46
Figure 12	Carte de la wilaya de Biskra (D.P.A.T., 2005).	47
Figure 13	Carte de la wilaya de Mila	48
Figure 14	Les étapes pour l'isolement et de l'identification des <i>Listeria spp.</i>	54
Figure 15	Place de <i>Listeria spp.</i> au sein des bactéries isolées.	67
Figure 16	Phylogramme avec Bootstrap des 10 souches construit selon l'algorithme NJ	72
Figure 17	Incidence géographique de <i>Listeria spp.</i> et des bactéries psychrotrophes dans les régions de Mila et de Biskra.	74
Figure 18	Incidence saisonnière de <i>Listeria spp.</i> dans le lait cru comparée à <i>Enterococcus spp.</i>	76

Graphique 1	AFM pour l'ensemble des bactéries isolées en fonction de la distribution spatio-temporelle.	78
Graphique 2	Classification hiérarchique Ascendante bactérienne selon UPGMA.	80
Graphique 3	Classification des trois groupes bactériens selon leurs barycentres spatio-temporels	81
Graphique 4	Classification hiérarchique ascendante selon les dimensions spatio-temporelles	83
Graphique 5	Cercle des corrélations inter bactériennes.	87
Graphique 6	Distribution des groupes spatio-temporels par rapport aux types de Gram (positif et négatif).	89
Figure 19	Distribution spatio-temporelle de <i>Listeria spp.</i> à Biskra	90
Figure 20	Distribution spatio-temporelle de <i>Listeria spp.</i> à Mila	91

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Prévalence de <i>L. monocytogenes</i> dans le lait cru (Larpent, 2004)	8
Tableau 2	Caractères biochimiques communs au genre <i>Listeria</i> (Larpent, 2004).	15
Tableau 3	Caractères biochimiques différentiels des espèces de <i>Listeria</i> (Larpent 2000 ; Gillespie et Hawkey, 2006 ; Jemmi et Stephan, 2006).	16
Tableau 4	Caractères différentiels de <i>listeria</i> et les bactéries proches (Larpent 2004).	17
Tableau 5	Répartition des sérovars en fonction des espèces de <i>Listeria</i> (Larpent, 2004, Sutra <i>et al.</i> , 1998).	18
Tableau 6	Composition antigénique des différents sérovars de <i>Listeria</i> (Liu 2006).	19
Tableau 7	Sensibilité de <i>L. monocytogenes</i> vis-à-vis des antibiotiques (AFSSA, 2000).	20
Tableau 8	Caractéristiques biomoléculaires de <i>L. welshimeri</i> , <i>L. innocua</i> , et <i>L. monocytogenes</i> (Hain <i>et al.</i> , 2006)	34
Tableau 9	Motifs des ARNr 16S et 18S pour les trois domaines du vivant (Madigan et Martinko, 2007).	43
Tableau 10	Localisation géographique des six fermes de production laitière.	47
Tableau 11	Prélèvements des laits crus par site et par mois	49
Tableau 12	Composition de la solution mixte pour la PCR.	51
Tableau 13	Mélange réactionnel pour la PCR de séquençage.	60
Tableau 14	Bactéries isolées sur gélose au sang additionnée de Cefazoline	64
Tableau 15	Résultats de l'identification présomptive bactérienne	66
Tableau 16	Distribution des différentes bactéries isolées sur gélose sang cuit additionnée de Cefazoline	67
Tableau 17	Distribution comparée de <i>Listeria spp.</i> et <i>L. monocytogenes</i> dans le lait cru observée dans divers pays.	69
Tableau 18	Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank	70

Tableau 19	Origines des 10 souches séquencées et Blastées	71
Tableau 20	Matrice des distances (logiciel MEGA 4.0)	71
Tableau 21	Distribution géographique bactérienne (%) à Mila et à Biskra	73
Tableau 22	Matrice de similarité globale	79
Tableau 23	Matrice des distances	79
Tableau 24	Résultats de la dispersion spatio-temporelle par groupe	82
Tableau 25	Distances entre les barycentres des trois groupes bactériens	82
Tableau 26	Résultats par groupes spatio-temporels	83
Tableau 27	Distances entre les barycentres des différents groupes spatio-temporels	84
Tableau 28	Matrice des corrélations (Pearson (n)).	85
Tableau 29	Valeur propre et variation (%) exprimées par les composantes principales	85
Tableau 30	Corrélation des souches avec les axes 1 et 2	86
Tableau 31	Distributions bactériennes spatio-temporelles	89

Liste des abréviations et Acronymes

AA	Acide Aminé
ACP	Analyse en Composantes Principales
AFNOR	Association Française de Normalisation
AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
AFM	Analyse Factorielle Multivariée
aw	ativity of water
BET	Bromure d’Ethidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLASTN	BLAST Nucleotide
BLH	Bovin Laitier Hybride
ddNTP	didésoxycléoside triphosphate
dNTP	désoxycléoside triphosphate
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Peterson-Test
CHA	Classification Hiérarchique Ascendante
DDBJ	Dna DataBase of Japan
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EN	Normes Européennes
FAO	Food and Agriculture Organization
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Point
<i>iap</i>	invasive associated protein
<i>inlA</i>	gène codant pour l’Internaline A
ISO	International Standard Organization
JORADP	Journal Officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire
Kb	Kilo base
LIPI	<i>Listeria</i> pathogénicité îlot
LLO	ListérioLysine O
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF	Norme Française
NJ	Neighbor-Joining
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl- β -Galactosidase
OTU	Operational Taxonomic Unit
pb	paire de base
PlcA	phospholipase A

PPC	produits prêts à la consommation
RADP	Random Amplified DNA Polymorphism
RFLP	Restricted Fragment Length Polymorphism
rpm	rotation par minute
<i>St</i>	<i>Staphylococcus</i>
TAE	Tris Acétate EDTA
TE	Tris-EDTA
TSI	Triple Sugar Iron
ufc	unités formant colonie
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with arithmetic Average

TABLE DES MATIERES

Partie1 : Synthèse Bibliographique

INTRODUCTION.....	1
1. LE MICROBIOTE DU LAIT CRU.....	5
1.1. Le microbiote originel.....	5
1.2. Le microbiote de contamination.....	5
1.3. <i>Listeria</i> et le lait.....	8
2. BIOLOGIE DES <i>Listeria spp</i>.....	9
2.1. Introduction historique	9
2.2. Taxonomie de <i>Listeria spp</i>	11
2.3. Caractères généraux des <i>Listeria spp</i>	13
2.3.1. Caractères morphologiques.....	13
2.3.2. Caractères cultureux	14
2.3.3. Caractères biochimiques.....	15
2.3.4. Sérotypie	18
2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques	19
2.4. Isolement et Identification de <i>L. monocytogenes</i>	21
2.4.1. Méthodes Bactériologiques.....	21
2.4.2. Lysotypage.....	22
2.4.3. Identification génotypique.....	22
2.5. Epidémiologie des listérioses.....	24
2.5.1. La listériose animale.....	24
2.5.2. Epidémiologie en médecine vétérinaire	26
2.5.3. Epidémiologie en médecine humaine.....	26
2.5.4. Contamination et transmission.....	28
2.6. Ecologie et habitat.....	31
3. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET PHYLOGENIE DE <i>Listeria spp</i>.....	34
3.1. Structure du génome de <i>Listeria spp</i>	34
3.2. Les gènes de <i>Listeria spp</i>	37
3.3. Régulation biomoléculaire de la virulence de <i>L. monocytogenes</i>	39
3.4. Construction d'arbres phylogénétiques.....	41
3.4.1. Choix des gènes cibles.....	42

3.4.2. Méthodes de construction des arbres phylogénétiques.....	44
3.4.2.1. La méthode UPGMA.....	44
3.4.2.2. La méthode NJ.....	45
3.4.3. Phylogénie de <i>Listeria spp.</i>	46

PARTIE 2 : REALISATION EXPERIMENTALE

1. MATERIEL.....	47
1.1. Localisation géographique et description des échantillons.....	47
1.2. Milieux pour l'isolement et la purification des bactéries.....	50
1.3. Biologie moléculaire.....	51
2. METHODES.....	53
2.1. Analyses bactériologiques.....	53
2.1.1. Culture et isolement.....	53
2.1.2. Identification phénotypique des souches.....	55
2.1.3. Identification génotypique des souches.....	55
2.2. Analyses statistiques.....	62
3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	64
3.1. Incidence totale.....	64
3.2. Séquençage ARNr 16S et Analyse bioinformatique moléculaire.....	70
3.3. Incidence géographique.....	73
3.4. Incidence saisonnière.....	74
3.5. Incidence spatio-temporelle.....	78
CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	94
BIBLIOGRAPHIE.....	97
ANNEXES.....	107
ADDENDA	

INTRODUCTION

L'évaluation quantitative des risques microbiologiques dans les aliments est devenue un travail prioritaire chez les spécialistes du risque bactériologique.

L'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS) ont répondu favorablement à la requête du Comité du *Codex alimentarius* sur l'hygiène alimentaire (CCFH)¹ qui a établi une liste de combinaisons "pathogènes-produits alimentaires" pour lesquelles il a demandé leur avis d'experts en évaluation des risques. La FAO et l'OMS ont lancé conjointement un programme pour fournir des avis d'experts microbiologistes sur l'évaluation des risques des dangers microbiologiques dans les aliments et 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. Ce travail a constitué l'avant-projet des directives pour l'application de principes généraux d'hygiène alimentaire. Le rapport fait état de la réduction de l'occurrence de *L. monocytogenes* dans les aliments plutôt que de la réduction des risques de listériose.

Le journal officiel de l'union européenne (Règlement CE N°2073/2005 de la commission du 15 novembre 2005), quant à lui, prévoit d'analyser tous les produits prêts pour la consommation et maintient d'ailleurs une concentration de *L. monocytogenes* à 100 ufc/g.

En matière de réglementation, la Directive européenne 92/46/CEE, entrée en vigueur le 1^{er} janvier 1994, définit des critères microbiologiques qui tiennent compte de la spécificité des fromages au lait cru et des exigences de protection de la santé du consommateur pour trois types de critères, à savoir pour *L. monocytogenes*, pour *Salmonella* spp. et pour les germes témoins d'un défaut d'hygiène (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*).

Le produit phare de la liste des produits à large consommation reste le lait ; plus particulièrement le lait cru de vaches en raison de sa riche composition nutritionnelle : graisses, lactose, sels minéraux, vitamines et l'eau (Guiraud J.P., 2003) ; mais il n'est pas tout à fait sans risque pour le consommateur car il constitue le foyer par excellence pour la communauté bactérienne. Cela va conduire à un fait évident : la biodiversité observée dans ce produit (Gerrit, 2003).

L'intérêt de la recherche de *L. monocytogenes* est confirmé par l'importance que lui accorde le journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire (JORADP) N° 3, arrêté du 21 Châabane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rend obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers. En Europe également, les normes V 08-055 (1993) et V 08-28-1 (respectivement, Microbiologie alimentaire – Méthodes de routine et Microbiologie alimentaire – Directives générales) concernent la recherche de *L. monocytogenes*.

Des bactéries principalement psychrotrophes appartenant à divers genres ont été isolées à partir du lait cru (Hantsis-Zacharov et Halpern, 2007) :

- **Gram négatif** : *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter*, et *Flavobacterium*.

¹ (<http://www.fao.org/docrep/008/y5393f/y5393f08.htm>)

- **Gram positif** : *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, et *Lactobacillus*.

Les fréquences de contamination des laits crus, c'est-à-dire ceux qui n'ont subi aucun traitement thermique, sont variables selon les études effectuées dans différents pays. Cette variabilité peut en partie être expliquée par les différences de plans d'échantillonnage, de sites de prélèvements et de méthodes de recherche de *L. monocytogenes* (Hamdi *et al*, 2007). Les études ont montré différents niveaux de contamination par *L. monocytogenes* dans le lait cru : 0% en Italie et en Suisse, 1% en Suède, 2% en Corée, 7% aux Etats Unis d'Amérique, 12% au Canada, et 13% au Brésil (Ha *et al*, 2002 ; Jemmi et Stephan, 2006).

Les seuls résultats obtenus jusqu'ici en Algérie concernant le taux de contamination du lait cru par *L. monocytogenes* sont ceux de Bellouni (1990) qui a analysé 35 échantillons et trouvé un seul résultat positif (3,2%), et ceux de Lebres et Mouffok (2000) qui ont trouvé une valeur de 1,9%. Une étude réalisée par Hamdi *et al*. (2007) a révélé 2,61% de *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de lait de ferme récolté dans les régions d'Alger et de Blida. Enfin, Bouayad (2012), en travaillant sur des produits alimentaires prêts à la consommation, a relevé 9,3 % de contamination par *Listeria spp*.

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

On s'accorde aujourd'hui à reconnaître que la listériose est attribuable en grande partie à la transmission *L. monocytogenes* par les aliments (toxi-infection alimentaire pouvant entraîner une septicémie et une méningite). 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*. Les manifestations cliniques varient des gastroentérites fébriles à des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombencéphalites, infections prénatals et avortements. Différemment des autres pathogènes des infections d'origines alimentaires, la listériose est associée à des cas de mortalité qui peuvent atteindre des valeurs de 20-30% (Allerberger et Wagner 2010). *L. monocytogenes* est aussi la cause de maladies chez les vaches laitières, incluant les avortements et les infections du système nerveux centrale (Kongo *et al*, 2006).

Au point de vue épidémiologique, *L. monocytogenes* est susceptible de contaminer tous les aliments frais à tous les stades de leur croissance ou de leur fabrication. Les aliments les plus fréquemment incriminés dans les épidémies de listériose sont des produits alimentaires prêts à consommer comme certaines viandes ou des produits laitiers non pasteurisés (cas du lait cru) stockés pendant une longue durée, même s'ils ont été réfrigérés à 4°C (Madigan M et Martinko J, 2007). C'est d'ailleurs pour cette raison que *L. monocytogenes* est utilisée comme indicateur d'hygiène dans toutes les étapes de la chaîne de transformation alimentaire (Bornert 2000 ; Jemmi et Stephan, 2006).

La listériose a causé d'importantes épidémies dans l'intervalle des années 80 car non reconnue jusque là comme responsable d'épidémie d'origine alimentaire. En Suisse, l'épidémie de 1983-1987 a fait 122 cas dont 31 décès. On a noté alors que 21 % des souches provocatrices de cette épidémie d'origine alimentaire proviennent des produits laitiers. Entre 1988 et 1990, en Allemagne, 3027 échantillons de produits fromagers et 311 ont été contaminés par *L. monocytogenes*. En Norvège 78 aliments sont contaminés par *L. monocytogenes* sur un total de 460 analysés.

Le véritable danger des *Listeria* réside dans la nature de ses sérovars. Larpent (2004) note 279 cas de listériose en France en décembre 1992 dus au sérovar 4b lysovar 2389/2425/3274/2671/47/108/340. Cette épidémie a entraîné 63 décès et 22 avortements avec des formes cliniques distinctes : 33 % néonatales, 67 % de formes adultes (5 enfants et 182 adultes). De plus, le centre national de référence (France, CNR) a traité les sérovars 1/2a, 4b, 1/2b et 1/2c qui ont représenté les fréquences respectives de 38 %, 26 %, 20 % et 9 %. Cependant, Espaze *et al.*, 1991) rajoute que le sérovar le plus isolé des produits laitiers est le 1/2a, celui isolé des produits carnés est le 1/2c. Les produits carnés italiens n'ont pas échappé à la contamination par *Listeria*. Les sérovars suivants ont été isolés : 1/2a (17,6 %), 1/2b (10 %), 1/2c (55,9%), 3c (2,2%), 4b (13,2 %) et 4c (1,1%).

Bien que l'exposition à ce germe soit très fréquente, la listériose reste une maladie rare. C'est une septicémie d'origine digestive conduisant souvent à la méningite. La mortalité peut atteindre 20%. On dénombre environ 2500 cas de listériose par an, entraînant 500 décès (Madigan M et Martinko J, 2007).

La stratégie adoptée pour la réalisation de notre travail, s'est basée sur cette question importante : **Sur la base des différents travaux menés par les différentes associations et/ou organisations concernant les risques liés à la contamination des aliments par *L. monocytogenes*, est-il possible d'établir une évaluation des risques liés à *L. monocytogenes* pour le lait cru en fonction de l'origine géographique et de la saison de son prélèvement ? En d'autres termes, quelle est la place spatio-temporelle de *L. monocytogenes* dans les différents laits récoltés lors de cette étude ?**

Delà vont découler les principaux objectifs proposés comme réponse à cette question :

Objectif 1 : Mettre en évidence la présence de *Listeria sp* (dont *L. monocytogenes*) et les autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin récoltés dans les fermes de production laitière situées dans deux régions de climats différents ; (1) la zone Nord-Est dans la région de Mila et (2) la zone semi-aride dans la région de Biskra. Pour cela, le travail s'est effectué selon les étapes suivantes :

- Etude de l'incidence totale.
- Etude de l'incidence géographique.
- Etude de l'incidence saisonnière.

Objectif 2 : Décrire le comportement spatio-temporelle de *Listeria spp.* au sein de la communauté bactérienne isolée.

L'approche expérimentale proposée pour la réalisation de ce travail comportera globalement les étapes suivantes :

- 1- les tests d'identification bactérienne qui comprennent les étages phénotypique (tests classiques d'isolement et d'identification) et moléculaire (traitement bioinformatique des séquences ADN 16S isolées des différentes souches par alignement selon l'algorithme de BLAST pour confronter nos séquences à celles enregistrées sur GenBank, EMBL et DDBJ),
- 2- Estimation de l'incidence spatio-temporelle par une analyse factorielle des données.

1. LE MICROBIOTE DU LAIT CRU

Le lait prélevé dans de bonnes conditions d'hygiène à partir d'un animal sain contient peu de microorganismes (moins de 10^3 germes/mL), mais il est tout de suite contaminé par une panoplie de germes. Il constitue un écosystème favorable pour le développement des microorganismes. Certains d'entre eux sont utiles, d'autres sont pathogènes pour l'animal et l'homme et d'autres sont responsables d'altération de la qualité sensorielle, organoleptique et nutritionnelle du lait. Le microbiote du lait est subdivisé en deux catégories : le microbiote originel et le microbiote de contamination. Ce dernier est subdivisé en deux catégories: les agents d'altération et les agents pathogènes (Figure 1).

1.1. Le microbiote originel

Le lait contient peu de microorganismes lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain (moins de 10^3 germes/mL). Il s'agit de germes essentiellement saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques mais aussi streptocoques lactiques (*Lactococcus*) et lactobacilles. Le lait est protégé par des substances inhibitrices appelées « lacténines » mais, leur action est de courte durée (1 heure environ) (Guiraud, 1998).

1.2. Le microbiote de contamination

Selon Guiraud (1998), le lait se contamine par des apports microbiens d'origines diverses :

- fèces et téguments de l'animal : coliformes, entérocoques, *Clostridium*, éventuellement Entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*), etc.
- sol : *Streptomyces*, *Listeria*, bactéries sporulées, spores fongiques, etc.
- litières et aliments : flore banale variée, en particulier lactobacilles, *Clostridium* butyrique (ensilage).
- air et eau : flores divers dont *Pseudomonas*, bactéries sporulées, etc.
- équipement de traite et de stockage du lait : microcoques, levures et flore lactique avec lactobacilles, streptocoques (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*), *Leuconostoc*, etc.
- manipulateurs : staphylocoques dans le cas de traite manuelle, mais aussi germes provenant d'expectorations, de contamination fécale, etc.
- vecteurs divers (insectes en particulier) : flore de contamination fécale.

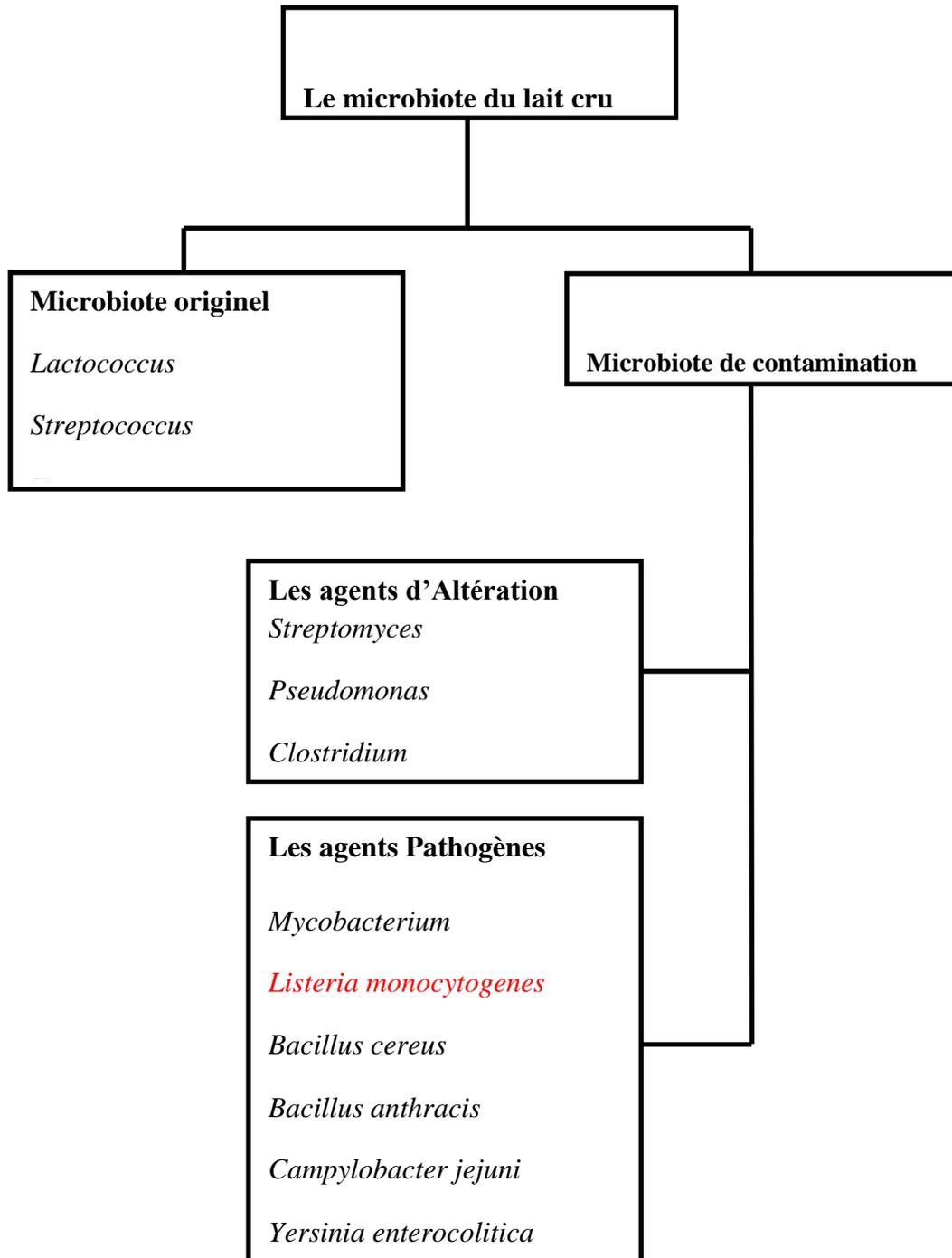


Figure 1 : Les principaux germes constituant le microbiote du lait cru (Guiraud, 1998).

Le lait peut être une importante source de pathogènes responsables d'intoxication alimentaire. La présence de pathogènes dans le lait est due au contact direct avec les sources contaminées dans l'environnement des fermes laitières et à partir des sécrétions des mamelles d'animaux infectés. La qualité microbiologique du lait est importante pour les raisons suivantes :

- des maladies de l'homme ont été reliées à la consommation de lait non pasteurisé et ont été aussi reliées au lait pasteurisé,
- le lait non pasteurisé est consommé directement par les producteurs de lait, les employés de la ferme et leurs familles, les voisins, et les partisans du lait cru,
- le lait non pasteurisé est consommé directement par un large segment de population via la consommation de divers types de fromages fabriqués à partir de lait non pasteurisé,
- l'entrée des pathogènes via le lait cru contaminé dans le processus industriel des produits laitiers peut aboutir à leur persistance dans les produits finis et l'exposition du consommateur aux bactéries pathogènes,
- la pasteurisation ne peut pas détruire tous les pathogènes dans le lait,
- la pasteurisation inadéquate ou défectueuse ne détruira pas tous les pathogènes. De plus, les pathogènes comme *L. monocytogenes* peuvent survivre et se développer bien dans l'environnement du processus post-pasteurisation, donc aboutissant à la recontamination des produits laitiers. Ces chemins posent un risque pour le consommateur par une exposition directe aux pathogènes présents dans les produits laitiers non pasteurisés (Oliver *et al.*, 2005).

Une variété de bactéries pathogènes a été isolée à partir du lait cru incluant *Mycobacterium*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Cela dépend du pays d'origine, espèces, climat et conditions sanitaires. Le lait peut contenir un ou plus des pathogènes cités (Gerrit 2003).

Dans les procédés de production laitière, la plupart des pathogènes ne sont pas considérés comme un problème si la pasteurisation est efficace dans la destruction de ces organismes. Cependant, de nombreux cas d'intoxications alimentaires ont été rapportés, causées par exemple par, *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* et *Yersinia*, dues à une contamination post-pasteurisation. La production d'entérotoxines thermostables dans le lait cru par *S. aureus* peut aussi causer des maladies via une variété de produits incluant le lait pasteurisé, fromage, crème glacée, beurre et lait écrémé déshydraté (Gerrit 2003).

D'autres microorganismes peuvent se trouver dans le lait lorsqu'il est issu d'un animal malade; ils sont généralement pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire. Il peut s'agir d'agents de mammites : streptocoques pyogènes, corynébactéries pyogènes, staphylocoques, etc. Il peut s'agir de germes d'infection générale qui peuvent passer dans le lait en absence d'anomalies du pis : *Salmonella*, *Brucella* et exceptionnellement *L. monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnettii* et quelques virus (Guiraud, 1998).

Le lait et les produits laitiers sont parmi les aliments les plus contrôlés depuis la ferme jusqu'au point de vente. Ils sont soumis à une chaîne de vérifications dont l'objectif est de garantir la sécurité du consommateur. Elle regroupe un ensemble de règles de travail et de contrôles institué tant par les pouvoirs publics que par la profession laitière. La qualité du produit à la ferme est surtout liée à l'hygiène, que ce soit des locaux, du matériel, du personnel, de la traite, mais aussi à la surveillance sanitaire des animaux et à une alimentation de qualité (AFSSA, 2000).

Par rapport à la température de croissance, les psychrophiles (ou psychrotrophes) sont capables de se développer en dessous de 15-20 °C, y compris pour certains jusqu'à des températures négatives. Il existe des psychrophiles facultatifs et d'autres obligatoires (psychrophiles au sens strict). Ces derniers ne sont en général pas capables de se développer à 20 °C. On trouve parmi les psychrophiles facultatifs de nombreuses bactéries à Gram négatif saprophytes (dont *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, etc.), des moisissures (*Cladosporium*, *Sporotrichum*, etc.) et des germes pathogènes (*Listeria*, *Yersinia*) (Guiraud, 2003). Indépendamment de la température optimale de croissance, il est d'usage de qualifier de psychrotrophes les micro-organismes qui conservent une activité notable à des températures inférieures ou égales à +7°C (Bornert 2000).

1.3. *Listeria* et le lait

Le lait constitue un vecteur principal de transmission des *Listeria* du fait qu'elle soit extrêmement résistante aux conditions du milieu extérieur (fermes, transport, etc.), notamment le froid car psychrotrophe. Aux USA 12 % des échantillons de laits crus sont contaminés par *L. monocytogenes*, en Espagne 46 %, en France 4 % (Skovgaard, 1990). La prévalence de *L. monocytogenes* dans le lait cru dans quelques est donnée dans le tableau suivant :

Tableau 1: Prévalence de *L. monocytogenes* dans le lait cru (Larpent, 2004)

Incidence (%)	Nombre d'échantillons	Pays
1,0	1004	Allemagne
45,3	95	Espagne
4,4	137	Pays-Bas
5,4	315	Ontario
4,0	200	Nebraska
4,2	350	USA

Les recherches menées sur la microbiologie du lait cru indiquent que la contamination par *L. monocytogenes* varie en général entre 0 et 45,3% depuis la collecte du lait jusqu'au consommateur (Prasad et Gupta, 1990). Cette fréquence est également liée au type de saison : le lait cru est principalement contaminé au printemps et en été.

Aux USA, l'incidence des *Listeria* dans les produits laitiers non fermentés a révélé deux cas de *L. monocytogenes* sur 350 laits crus analysés (soit une fréquence de 0,57). Ryser (1987) note un taux de 2 à 4 % de contamination du lait cru par *L. monocytogenes*. Il ajoute que la bactérie se développe dans les trois premiers jours de stockage à une température inférieure à 8 °C et augmente de 10 fois en sept jours à 4 °C. Enfin, Rosenow et Marth (1987) indiquent que le temps de génération (en heures) de *L. monocytogenes* dans des échantillons stérilisé de lait cru varie en fonction de la température. Il passe de 33,06 à 33,27 lorsque la température passe 8 °C à ' °C. Il devient presque nul (0,692) lorsque la température atteint 35 °C.

2. BIOLOGIE DES *Listeria spp.*

2.1. Introduction historique : *Listeria* doit son nom à la mémoire du Docteur John Lister. Elle est caractérisée par une élévation anormale du taux de monocytes chez son hôte d'où son nom de *monocytogenes*.

- La découverte de *Listeria monocytogenes*, responsable de listériose humaine et animale, date du début du XX^{ème} siècle.
- En 1911, Hefphers, vétérinaire Suédois, fut le premier auteur à avoir décrit cette infection chez un lapin atteint de méningite.
- En 1918, Dumont et Cotoni isolèrent une bactérie ressemblant à *Erysipelothrix rhusiopathiae* du liquide céphalorachidien d'un soldat servant en France atteint de méningite. Cette bactérie fut conservée à l'Institut Pasteur de Paris et identifiée en 1940 comme étant *L. monocytogenes*.
- En 1924, Murray et ses collègues, durant leur investigation expérimentale sur les animaux, isolèrent une bactérie des ganglions lymphatiques des animaux affectés. Quand ces bactéries sont injectées à des animaux sains, elles induisent une monocytose. Ils lui accordent le nom de *Bacillus monocytogenes*.
- En 1926, c'est la première description de ce petit bacille par Murray, Webb et Swann. Ils isolèrent un germe à Gram positif du sang des lapins et des cobayes qui représentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent le nom *Bacterium monocytogenes*.
- En 1927, en Afrique du Sud, Pirie qui étudiait le portage de *Yersinia pestis* par les rongeurs, isola la même bactérie des foies des espèces de gerbille africaine, sous le nom de *Listerella hepatolytica*. Cette bactérie était non distinguable de *B. monocytogenes*. Plus tard, Pirie proposa le nom de *Listeria monocytogenes*.
- En 1929, Nyfeldt isola une bactérie qu'il nomma *Bacterium monocytogenes hominis* à partir d'hémocultures de patients atteints de fièvre ganglionnaire, et il fut convaincu qu'il a isolé l'agent causal de la mononucléose infectieuse.
- En 1933, Brun démontre le rôle de la bactérie dans l'infection périnatale.
- *Bacterium monocytogenes* et *Listerella hepatolytica* semblant être le même organisme, le nom de *Listerella monocytogenes* fut proposé et conservé jusqu'en 1939. On se rendit compte alors que le nom de *Listerella* était déjà utilisé pour désigner un champignon et en 1940, le nom de *Listeria monocytogenes* fut officiellement adopté.
- A partir de 1951, Reiss, Potel et Krebs 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.
- En 1960, les infections humaines à *Listeria* ont été diagnostiquées.
- En 1981, la première mise en évidence de la transmission alimentaire de la listériose humaine (Sutra *et al*, 1998 ; Berche 1999 ; Gillespie et Hawkey, 2006).

Selon Lebres (2006), ont été décrits en Algérie :

- Le premier cas clinique de listériose humaine par Benallègue *et al.* (1967).
- Bellouni (1989) a isolé 11 souches de *Listeria*, réparties comme suit : 2 *L. monocytogenes*, 1 *L. welshimeri*, 2 *L. seeligeri* et 6 *L. innocua* à partir de 87 placentas de bovins, et 1 souche de *L. innocua* à partir de 16 fromages analysés.
- Ramdani (1999), 5 cas humains.
- Naim (2000) (Hôpital Central de l'Armée), 1 cas humain.
- Lebres (2000) : 10 souches de *Listeria* dont 7 *L. monocytogenes* et 3 *L. innocua* à partir de 419 échantillons de denrées alimentaires autres que le lait.
- Lebres et Guetarni (2004) : 28 souches de *Listeria* dont 10 *L. monocytogenes*, 17 *L. innocua* et 1 *L. ivanovii* à partir de 1432 échantillons de lait crus.

2.2. Taxonomie de *Listeria* spp.

Dans l'édition du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de 1986, le genre *Listeria* fait partie des bacilles à Gram positif réguliers et non sporulés avec *Lactobacillus*, *Erysipelothrix* et *Brochothrix*. A cette époque, le genre *Listeria* comprenait huit espèces : *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. murrayi* et *L. denitrificans*, les trois dernières étant considérées comme *species incertaesedis*, c'est-à-dire espèces de statut taxonomique incertain (Sutra *et al*, 1998).

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

1. *L. monocytogenes*
2. *L. ivanovii*
3. *L. seeligeri*
4. *L. innocua*
5. *L. welshimeri*
6. *L. grayi*

Listeria denitrificans a été connue comme *Jonesia denitrificans*. *Listeria murrayi* et *L. grayi* sont autrefois considérées suffisamment distinctes des autres *Listeria* spp., ce qui a justifié la création du nouveau genre *Murraya*, mais actuellement ils sont attribués à une seule espèce *L. grayi*. Plus récemment, *L. ivanovii* a été divisée en deux sous espèces : subsp. *ivanovii* et subsp. *londoniensis*. Parmi les espèces non-*monocytogenes*, seulement *L. ivanovii* est reconnue comme pathogène humain (Vazquez-Boland *et al*, 2001 ; Gillespie et Hawkey, 2006).

Selon Larpent (2004), l'évolution de la taxonomie des *Listeria* (Figure 2) a démontré que ce genre est constitué de deux branches distinctes :

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

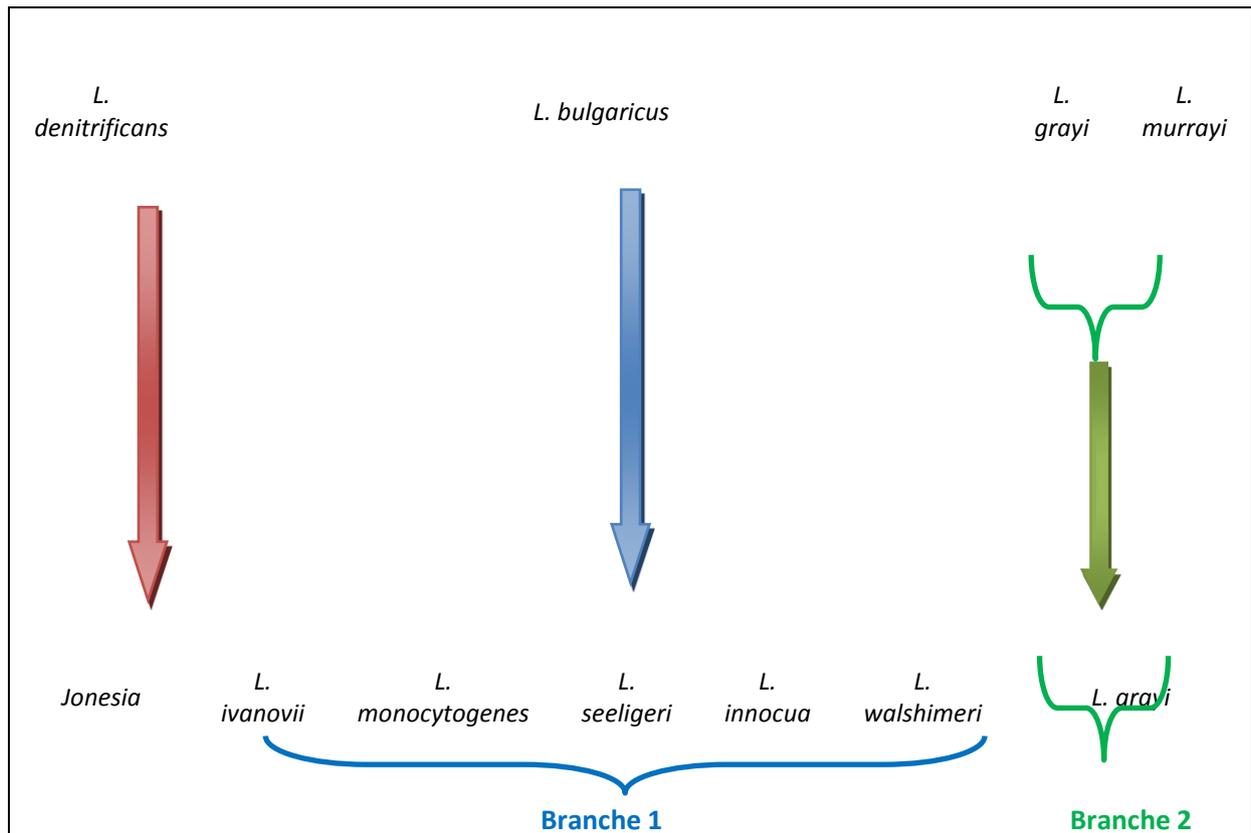


Figure 2 : Evolution de la taxonomie des *Listeria* (Bind, 1990)

La classification hiérarchique du genre *Listeria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr 16S est représentée comme suit (Garrity *et al.*, 2007)

Empire : Procaryote
 Domaine : *Eubacteria*
 Phylum : *Firmicutes*
 Classe : *Bacilli*
 Ordre : *Bacillales*
 Famille : *Listeriaceae*
 Genre : *Listeria*

Selon Gillespie et Hawkey (2006) *Listeria* était considérée, comme membre de la famille des *Corynebacteriaceae*, à cause de ces caractères morphologiques. Les études chimiotaxonomiques ont démontré que *Listeria* était tout à fait distincte des corynébactéries. Le séquençage partiel du gène ARNr 16S confirmait clairement la place phylogénétique du genre *Listeria* dans le groupe de *Clostridium-Bacillus-Lactobacillus*, dans le proche voisinage de *Brochothrix thermosphacta*.

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

2.3. Caractères généraux des *Listeria spp.*

L. monocytogenes est une bactérie pathogène opportuniste responsable de la listériose humaine, une infection d'origine alimentaire touchant préférentiellement les sujets aux âges extrêmes de la vie, les nouveau-nés, les femmes enceintes et les patients immunodéprimés. Les bactéries ingérées avec la nourriture contaminée traversent l'intestin et gagnent le foie, puis disséminent par voie sanguine vers le système nerveux central. Les manifestations cliniques varient des gastroentérites fébriles à des formes sévères invasives incluant les septicémies, méningites, rhombocéphalites, infections prénatales et avortements (Lecuit et Cossart, 2000 ; Berche *et al.*, 2002 ; Allerberger et Wagner, 2010). Seulement les espèces hémolytiques de *Listeria* : *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, et *L. seeligeri*, sont pathogènes pour l'homme (Cocolin *et al.*, 2002).

L. monocytogenes est un psychrotrophe ubiquitaire capable de survivre dans des conditions de stress froid et salin. Elle est rencontrée dans l'industrie de la transformation et le traitement des aliments (Elmnasser *et al.*, 2006). Usuellement, la présence des espèces de *Listeria* dans un aliment est un indicateur d'une hygiène pauvre (Cocolin *et al.*, 2002 ; Jemmi, et Stephan, 2006). Le traitement par la chaleur réduit significativement la concentration de *L. monocytogenes*, donc le lait pasteurisé ne représente pas un risque important pour la santé humaine (Sanaa *et al.*, 1993).

L. monocytogenes est aérobie-anaérobie facultative chimio-organo-hétérotrophe. Elle est Catalase positive (ce caractère distingue les espèces de *Listeria* des Streptocoques) et Oxydase négative (Ryan et Ray, 2004).

2.3.1. Caractères morphologiques

Les *Listeria* sont des bâtonnets ou coccobacilles Gram positif, aux extrémités arrondies, de 0,4 à 0,5 μm de diamètre et 0,5 à 2 μm de long, asporulés, non acido-alcool-résistants. Ils se présentent de manière isolée, associés en V, en chaînettes ou en palissades. La bactérie est non capsulée et sans granulation métachromatique (Anonyme 2003 ; Sutra *et al.*, 1998).

La bactérie est mobile au moyen de 5 à 6 flagelles péritriches quand elle est cultivée à 20-25°C, et immobile ou faiblement mobile à 37°C. La mobilité est caractéristique car la bactérie semble tourner sur elle-même " mobilité en pirouette " (Singleton 1999 ; AFSSA 2000 ; Ryan et Ray, 2004). Sur milieu mannitol mobilité après incubation à 25°C, *L. monocytogenes* donne une image typique de sapin renversé, témoignant de son caractère microaérophile.

Dans les essais de culture traditionnelle, il est très difficile de détecter et d'énumérer *L. monocytogenes* dans les aliments surtout quand celle-ci est largement surpassée en nombre par les autres *Listeria spp.* spécialement *L. innocua*. Par conséquent, la détection de *Listeria spp.* est souvent utilisée comme indication de la présence de *L. monocytogenes* (Cocolin *et al.*, 2002).

2.3.2. Caractères cultureux

La culture des *Listeria* n'est pas difficile. Ils se développent sur gélose au sang en petites colonies β -hémolytiques. Sur gélose nutritive, après 24 heures d'incubation, les colonies sont petites (< 1,5 mm), lisses, transparentes et convexes à bords réguliers (Sutra *et al.*, 1998 ; Ryan et Ray, 2004). *L. monocytogenes* se développe bien dans les milieux empiriques riches (milieu coeur-cerveille, milieu à la peptone de caséine et de soja additionné d'extrait de levure). L'apport d'esculine et de citrate de fer stimule la croissance. En milieux synthétiques, ses exigences de base concernent certains amino-acides, des vitamines, mais pas de bases nucléiques (AFSSA, 2000).

L. monocytogenes peut se développer entre 1 et 44°C. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Le temps de doublement à 35°C est de 40 min, mais *Listeria* se développe bien entre +3 et +4°C voire même à -2°C. Le temps de doublement à +4°C est de 15 heures (Guiraud 1998 ; AFSSA, 2000 ; Ryan et Ray, 2004 ; Elmnasser *et al.*, 2006 ; Jemmi et Stephan, 2006). La croissance à +4°C est une particularité qui peut être utilisée comme procédé d'enrichissement (Elmnasser *et al.*, 2006, Jemmi et Stephan, 2006). La conservation à la température de réfrigération élimine les bactéries concurrentes, et stimule donc la croissance de *L. monocytogenes* (Elmnasser *et al.*, 2006). L'habilité à persister dans les environnements du processus alimentaire et à se multiplier aux températures de réfrigération fait de *L. monocytogenes* une menace significative pour la santé publique (Jemmi et Stephan, 2006).

Les températures minimales de croissance observables sur gélose trypticase-soja dans une durée d'incubation de 10 jours sont comprises entre +0,5°C et +3,0°C, avec une moyenne de +1,1°C. Si le temps d'incubation est supérieur à 50 jours, la température minimale de croissance atteint -0,4°C, voire des valeurs inférieures. *L. monocytogenes* n'est pas considérée comme un germe thermorésistant et est rapidement détruite à 60°C. Toutefois, l'effet de divers prétraitements thermiques peut beaucoup influencer sa thermotolérance. Ainsi, un préchauffage à 47,5°C pendant 3 heures est celui qui prolonge le plus la résistance ultérieure à une température de 65°C des bactéries cultivées initialement à +4°C. Il est intéressant de noter également qu'un préchauffage de 3 heures à 37°C, avant un traitement à 62°C, entraîne à peu près les mêmes conséquences et dans les mêmes proportions. La faculté de préadaptation des *L. monocytogenes* aux traitements thermiques est réelle. Il est possible que cette faculté contribue à la survie de *L. monocytogenes* dans certains aliments subissant, au cours du processus de fabrication, un préchauffage avant pasteurisation (AFSSA, 2000).

Le pH optimal est un pH neutre ou légèrement alcalin, mais le germe peut croître entre pH 4,4 et 9,6. La survie est possible pour des pH inférieurs à 4,3. Cependant, la capacité de croissance de ce germe à pH acide dépend des souches, de la température, de la composition chimique du milieu ou de l'aliment et de l'acide utilisé pour ajuster le pH (Sutra *et al.* 1998; Fosse et Magras, 2004). *L. monocytogenes* est rapidement détruite au-dessus de pH 10 ou aux pH inférieurs au pH minimum. Elle peut toutefois survivre pendant de très longues périodes à des pH proches de pH 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs. Le stress alcalin (NaOH, pH 9) est rapidement surmonté par *L. monocytogenes* (AFSSA, 2000).

L. monocytogenes est une bactérie halotolérante. Elle possède d'étonnantes capacités d'adaptation au stress salin. En effet, elle est capable de croître en présence de 10 % voire même de 14 % de NaCl. Elle peut résister pendant 20 heures à une concentration de NaCl

saturée (40 %). De même, elle peut survivre dans du sel pur pendant 150 jours à température ambiante (Sutra *et al.*, 1998 ; Elmnasser *et al.*,2006).

La valeur optimale d'activité d'eau (aw) pour la croissance de *L. monocytogenes* est d'environ 0,97. Néanmoins, *L. monocytogenes* peut se multiplier à des valeurs d'aw de 0,92-0,93 (ce qui équivaut à une solution de 10% de NaCl) et survivre à des valeurs d'aw beaucoup plus faibles, de l'ordre de 0,8 (Sutra *et al.*, 1998). L'activité de l'eau minimale pour la croissance pour *L. monocytogenes* est de 0,90 quand le glycérol est utilisé pour ajuster ce facteur dans le milieu, de 0,92 ou 0,93 avec du NaCl et du saccharose ou si le milieu employé est à base d'extrait de viande (AFSSA, 2000).

L. monocytogenes est sensible *in vitro* aux désinfectants tels que: l'éthanol 70%, l'hypochlorite de sodium à 1%, glutaraldéhyde, ammonium quaternaire, même en présence de substances interférentes. L'inactivation par le chlore (largement utilisé en désinfection) est fonction de la concentration en chlore actif, du pH, de la température, du temps d'exposition et de la présence de substances organiques (Fosse et Magras, 2004).

2.3.3. Caractères biochimiques

L. monocytogenes est Uréase négative, fermente les sucres (formation d'acide, pas de gaz) et hydrolyse l'esculine (Gillespie et Hawkey, 2006). Les principaux caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria* (Larpent, 2004).

Réactions positives	Réactions négatives
Glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol	ONPG
Rouge de Méthyle	Oxydase
Voges-Proskauer	Gaz en glucose
Réduction du lait tournesolé	Uréase
Esculine	Indole
Catalase	Gélatinase
Mobilité à 22 °C	H ₂ S
Type respiratoire : aéro-anaérobie	Xylose, Ribose, Mannitol
Réduction du lait tournesolé	

Dans les cas où l'hémolyse n'est pas bien visible sur gélose au sang, ou encore dans les cas litigieux, on peut avoir recours au Camp Test (Christie-Atkins-Munch-Peterson-Test). Ce dernier a été proposé pour une meilleure distinction entre souche hémolytique et non hémolytique (Euzéby 2000).

Les principaux caractères biochimiques correspondant aux différentes espèces de *Listeria* figurent dans le Tableau 3 :

Tableau 3 : Caractères biochimiques différentiels des espèces de *Listeria* (Larpent 2000 ; Gillespie et Hawkey, 2006 ; Jemmi et Stephan, 2006).

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

+, ≥ 90% des isolats positifs; -, ≤ 10% des isolats positifs; ±, 11–89% des isolats positifs.

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

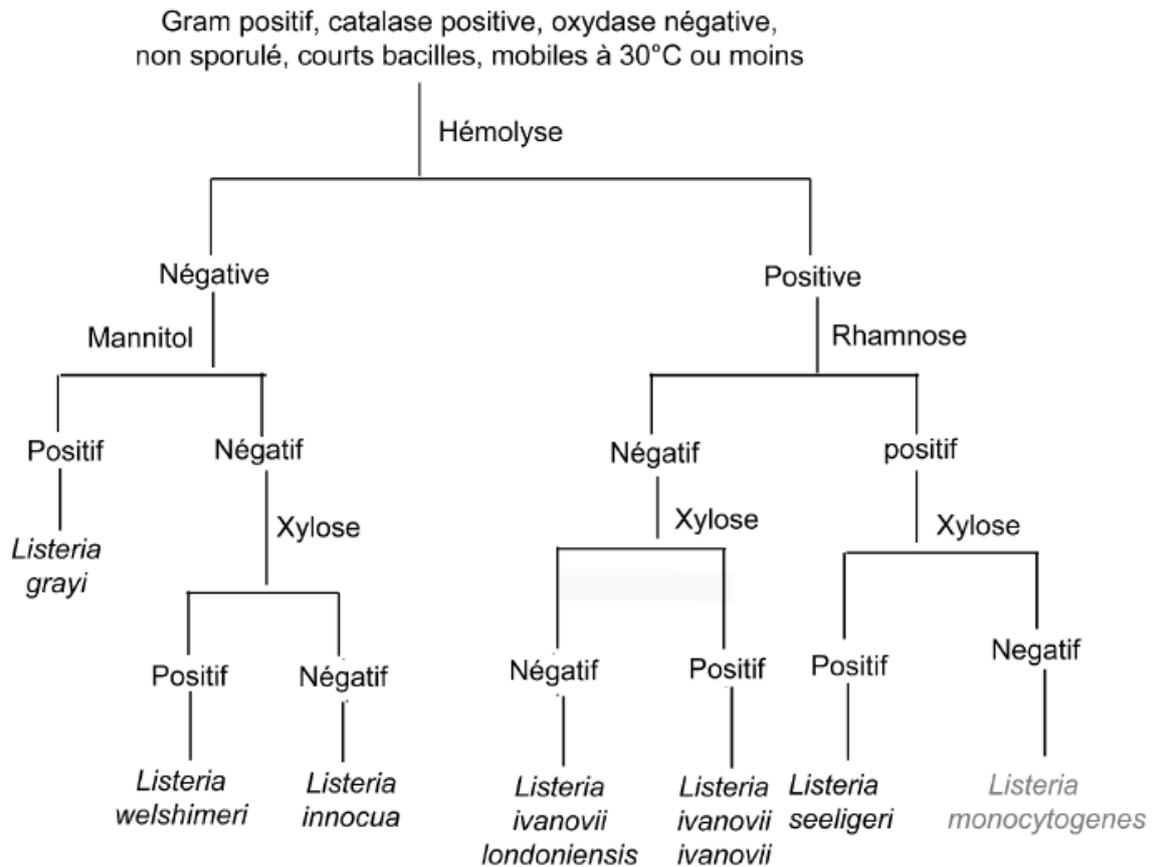


Figure 3 : Clé dichotomique pour l'identification des *Listeria spp.* (Gorski, 2008)

Les caractères différentiels entre *Listeria* et les bactéries voisines, figurent dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Caractères différentiels de *listeria* et les bactéries proches (Larpen 2004).

	<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
Mobilité à 25°C	+	-	-	-
Catalase	+	-	+	-
Esculine	+	-	-	+
H ₂ S	-	+	-	-
Lait tournesolé :				
Coagulation	-	-	-	+
Réduction	+	-	-	+

2.3.4. Sérotypie

- Au sein du genre *Listeria*, on définit des sérovars sur la base de deux types d'antigènes :
- 15 antigènes somatiques O thermostables désignés de I à XV.
 - 05 antigènes flagellaires H thermolabiles désignés de A à E.

La présence de 15 antigènes somatiques (AgO) et de 5 antigènes flagellaires (AgH) permet de reconnaître au moins 17 sérovars au sein du genre *Listeria*. Un sérovar peut correspondre à la combinaison de plusieurs antigènes O et d'un ou plusieurs antigènes H. Il n'y a pas de corrélation entre les sérovars et les espèces, comme il n'ya pas également de rapport entre un sérovar donné et son origine géographique ou animale. La composition antigénique des différents sérovars est présentée dans le Tableau 4 (Liu 2006).

Le sérotypage des *Listeria*, qui s'effectue à l'aide de sérums spécifiques, ne permet pas une identification des espèces. En effet, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, et *L. innocua* d'une part, et *L. innocua* et *L. welshimeri* d'autre part, ont en commun un ou plusieurs sérovars. Seule *L. ivanovii* possède un sérovar (sérovar 5) qui lui est propre. Donc, on distingue six sérogroupe (1/2, 3, 4, 5, 6 et 7) subdivisibles en sérovars pour toutes les espèces excepté *L. grayi* et *L. ivanovii* (Tableau 5) (Sutra *et al.*, 1998 ; Gillespie et Hawkey, 2006)

Il est à noter que 13 sérovars de *L. monocytogenes* sont couramment reconnus (Tableau 5), et plus de 90 % des isolats cliniques appartiennent à trois sérovars : 1/2a, 1/2b et 4b; ce qui limite la valeur de la technique de sérotypage dans les études épidémiologiques (Graves *et al.*, 1999 ; Gillespie et Hawkey, 2006).

Le diagnostic sérologique par agglutination, fixation du complément ou immunoprécipitation est peu sensible et peu spécifique. La détection des anticorps anti-listériolysine O est plus prometteuse. Un test de type dotblot, utilisant comme antigène de la listériolysine O purifiée, nécessite un traitement préalable des sérums pour éviter les réactions faussement positives dues à la présence d'anticorps anti-streptolysine O. Un test de Western-blot, faisant appel à un polypeptide produit par des techniques de biologie moléculaire et correspondant aux 411 premiers acides aminés de la listériolysine O (partie ne présentant pas d'homologie avec la streptolysine O) est beaucoup plus spécifique mais des réactions faussement positives sont observées (Euzeby 2010).

Larpen (2004) et Sutra (1998), font ressortir les différents sérovars des différentes espèces à l'intérieur du genre *Listeria* (tableau 5). Cependant, la composition antigénique somatique et flagellaire est représentée en détails sur le tableau 6 :

Tableau 5 : Répartition des sérovars en fonction des espèces de *Listeria* (Larpen, 2004, Sutra *et al.*, 1998).

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

Tableau 6 : Composition antigénique des différents sérovars de *Listeria* (Liu 2006).

Désignation des sérovars	Antigènes O	Antigènes H
1/2a	I II (III)*	A B
1/2b	I II (III)	A B C
1/2c	I II (III)	B D
3a	II (III) IV	A B
3b	II (III) IV (XII) (XIII)	A B C
3c	II (III) IV (XII) (XIII)	B D
4a	(III) V VII IX	A B C
4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
4b**	(III) V VI	A B C
4c***	(III) V VII	A B C
4d	(III) (V) VI VIII	A B C
4e	(III) V VI (VIII) (IX)	A B C
5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
7	(III) XII XIII	A B C
6a	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	A B C
6b	(III) (V) (VI) (VII) IX X XI	A B C
<i>L. grayi</i>	(III) XII XIV	E

* : () : Antigène pouvant être absent. ** : Quelques souches du sérovar 4b possèdent l'antigène IX. McLauchlin *et al.* ont isolé une souche inhabituelle du sérovar 4b dont la formule antigénique est (III) V VI VII A B C. *** : Selon Seeliger et Jones, certaines souches de *Listeria seeligeri* appartiennent au sérovar 4c.

2.3.5. Sensibilité aux antibiotiques

L. monocytogenes est une bactérie très sensible aux antibiotiques (tableau 7). Une résistance naturelle est notée vis-à-vis des céphalosporines (notamment de 3ème génération à large spectre comme la céfotaxime ou la céfépime), de l'aztréonam, de l'acide nalidixique, de l'ofloxacine (la D-ofloxacine est complètement inactive alors que le deuxième composant de l'ofloxacine, la lévofloxacine, est modérément active), des fluoroquinolones récentes et de la fosfomycine. La sensibilité est intermédiaire pour la céfalotine, la ciprofloxacine, le chloramphénicol et la clindamycine (AFSSA, 2000 ; Euzeby 2000 ; Berche *et al.*, 2002).

Les résistances acquises aux antibiotiques sont rares et touchent les tétracyclines et les macrolides. La sensibilité (en termes Sensible/Résistant) est donnée dans le Tableau 7.

Quelques rares souches sont capables d'acquérir une résistance à la streptomycine, à la kanamycine, à la gentamicine, au triméthoprime, aux tétracyclines ou à la rifampicine. L'émergence des souches résistantes résulte généralement de l'acquisition de plasmides ou de transposons conjugatifs. Ainsi, en 1988, une souche multirésistante a été isolée en France. Cette souche résistait à l'érythromycine, à la streptomycine, au chloramphénicol, à la tétracycline et à la minocycline. L'ensemble de ces caractères est porté par un plasmide de 37 kb (le plasmide p IP 811) également présent chez des souches d'*Enterococcus spp.* et de *Streptococcus spp.* *In vitro*, les plasmides de résistance aux antibiotiques des entérocoques se transfèrent facilement à des souches de *Listeria spp.*

Il est donc probable que ce transfert soit possible *in vivo* notamment lorsque des souches de *Listeria* sont hébergées dans le tube digestif. La pression de sélection, due à une utilisation

anarchique des antibiotiques, pourrait dans un proche avenir faire émerger de nombreuses souches de *Listeria* multirésistantes (Euzeby 2000).

Tableau 7 : Sensibilité de *L. monocytogenes* vis-à-vis des antibiotiques (AFSSA, 2000).

Antibiotique	Sensible/Résistant	Antibiotique	Sensible/Résistant
Amikacine	S	Ciprofloxacine	R
Amoxicilline	S	Clindamycine	R
Amoxicilline + acide clavulanique	S	Fosfomycine	S
ampiciline	S	Gentamicine, Sisomicine	S
Céfalexine, céfradine, céfadroxil, céfatrizine, céfaclor, loracarbef	R	Imipénème, Méropénème	S
Céfalotine, céfazoline, céfapirine, céfaloridine	R	Isépamicine	S
Céfamandole	R	Latamoxef	R
Céfépime	R	Lincomycine	R
Céfixime	R	Nétilmicine	S
Céfopérazone	R	Ofloxacine	R
Céfotaxime	R	Péfloxacine	R
Céfotétan	R	Pénicilline G	S
Céfotiam	R	Pipéracilline + Tazobactam	S
Céfotiam, Hexétil	R	Pipéracilline + Mezlocilline	S
Céfoxitime	R	Polymyxine	R
Cefpirome	R	Rifampicine	S
Cefpodoxime Proxétil	R	Synergistines	S
Ceftazidime	R	teicoplanine	S
Ceftizoxime	R	Thiophénicol	modérément S
Ceftriaxone	R	Ticarcilline	S
Céfuroxime	R	Ticarcilline + Acide clavulanique	S
Céfuroxime, Axétil	R	Tobramycine, Dibécacine	S
Chloramphénicol	modérément S	Triméthoprim-sulfaméthoxazole	S
		Vancomycine	S

R : Résistant ; S : Sensible

2.4. Isolement et Identification de *L. monocytogenes*

2.4.1. Méthodes Bactériologiques

Les *Listeria* ne sont pas des germes exigeants. Leur culture est obtenue sur les milieux classiques tels qu'une gélose nutritive ou une gélose au sang (Durand 1992). Dans les essais de culture traditionnelle, il est très difficile de détecter et d'énumérer *L. monocytogenes* dans les aliments surtout quand celle-ci est largement surpassée en nombre par les autres *Listeria spp.* spécialement *L. innocua*. Par conséquent, la détection de *Listeria spp.* est souvent utilisée comme indication de la présence de *L. monocytogenes* (Cocolin *et al.*, 2002).

L'isolement des espèces de *Listeria* n'est pas trop difficile, excepté pour les aliments très lourdement pollués par les autres espèces microbiennes. Les expériences passées dans les laboratoires cliniques ont indiquées que les essais d'isolement de l'organisme à partir d'échantillons biologiques positifs par culture directe du matériel suspect dans un milieu conventionnel échouaient souvent, alors que la proportion de l'isolement est améliorée quand les échantillons subissaient une période d'enrichissement à froid (Vardar-Ünlü *et al.*, 1998).

L'évolution des méthodes de recherche de *L. monocytogenes* a été très rapide. En 1986, cette recherche nécessitait 2 à 3 semaines. Aujourd'hui, elle peut se faire sans difficultés majeures à l'aide d'une méthode normalisée et reconnue Norme Française (NF), Norme Européenne (EN) et Norme Internationale (ISO) en 4 à 5 jours (ISO 11290-1 : Détection ; ISO 11290-2 : Dénombrement). C'est une méthode lourde, en plusieurs étapes, avec enrichissement primaire et secondaire en bouillon de Fraser et isolements sur milieux sélectifs, PALCAM et Oxford, après chaque étape d'enrichissement. La méthode AFNOR (Association Française de Normalisation) de routine pour la détection de *L. monocytogenes* correspond à la norme NF V 08 055 (AFSSA, 2000).

Parmi les techniques d'enrichissement, il existe une méthode à froid (méthode de Gray) basée sur le caractère psychrophile. Le produit à analyser est maintenu à +4°C (éventuellement dans du tampon PBS) ou pré-enrichi dans un bouillon tryptosé à +4°C. On utilise ensuite (en prélevant éventuellement à des temps différents) un bouillon d'enrichissement qui contient du rhamnose du bleu de méthylène de l'acide nalidixique, de la polymyxine B et de l'acriflavine : ce milieu est incubé pendant 2 jours à 25° C puis repiqué sur milieu d'isolement. On peut utiliser aussi un autre type de bouillon à l'acridine ou le milieu d'enrichissement de Feindt. D'autres milieux permettent d'effectuer un enrichissement à température classique (30-37°C). Le bouillon enrichissement pour *Listeria* (LEB) préconisé par la FIL et la FDA permet la recherche de *Listeria monocytogenes* : la cycloheximide, l'acide naxilidique et l'acriflavine sont les agents sélectifs. Le milieu est incubé pendant 24 à 48 heures à 30°C. Le bouillon MEB à une composition voisine (Guiraud 1998).

Le bouillon de Fraser contient du chlorure de lithium et du citrate de fer : le noircissement du milieu est présomptif de la présence de *Listeria*. Le milieu de Fraser peut être utilisé en deux étapes. La première faisant intervenir un milieu appelé Fraser 1/2, contenant moins d'inhibiteurs, pour permettre une meilleur revivification (Guiraud 1998).

Dans la méthode internationale normalisée NF EN ISO 11290-1. Vingt cinq grammes d'échantillon sont placés dans 225 mL de bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" et broyés au Stomacher. Le bouillon est incubé 24 heures à 30 °C puis isolé sur géloses PALCAM et Oxford. Un aliquote (0,1 ml) du bouillon Fraser "demi" est ensemencé dans 10

ml de bouillon d'enrichissement Fraser incubé 48 heures à 37°C. Après ce temps d'incubation le bouillon d'enrichissement Fraser est isolé sur géloses PALCAM et Oxford. Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies suspectes (5) sont repiquées sur des géloses non sélectives comme des géloses trypticase soja aux extraits de levure (incubées durant 18-24 heures à 37 °C) puis identifiées (Euzeby 2000).

D'autres milieux sont utilisables (Voir Annexe B):

- Gélose de Mac Bride au phényléthanol et à la cycloheximide.
- Gélose au sang, additionnée d'acide nalidixique et de colistine (ANC).
- Gélose de Despierre, gélose au sang ou Columbia ou trypticase-soja contenant acide nalidixique, polymyxine et rhamnose.
- Gélose nutritive à l'acridine (tryptaflavine) et à l'acide nalidixine (gélose *Listeria* de Feindt) qui contient en plus de la thiamine.
- Gélose LCA (gélose cœur-cerveau contenant chlorure de lithium, glycine et ceftazidime) (Guiraud 1998).

La recherche de *L. monocytogenes* par la Méthode AFNOR V08 055 nécessite plusieurs étapes (Lebres 2002) et est réglementée dans le JORADP dans l'Arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.

2.4.2. Lysotypage

La lysotypie, développée pour pallier les insuffisances du sérotypage, est également une méthode réservée aux laboratoires spécialisés. En 1981, un atelier de travail international a permis de sélectionner 29 phages (appartenant aux familles des *Myoviridae* et des *Styloviridae*) isolés de souches de *Listeria* spp. ou du milieu extérieur. De nombreuses souches, notamment des souches présentes dans les aliments ou dans le milieu extérieur, sont non typables mais, 93 p. cent des souches du sérovar 1/2 et 99 p. cent des souches du sérotype 4 se sont avérées typables dans une étude effectuée par Loessner. La lysotypie est très utile pour les enquêtes épidémiologiques et depuis 1991, la procédure dite "reverse" a simplifié la mise en œuvre de cette technique. Dans la procédure "reverse", les suspensions de phages sont déposées sur une gélose tryptose qui est mise à sécher puis ensemencée avec une culture en phase exponentielle de la souche à typer. La lecture est effectuée après 12 heures et 36 heures d'incubation. Les boîtes de gélose sur lesquelles sont absorbées les phages peuvent être préparées à l'avance et elles se conservent 6 semaines à +4°C ce qui facilite la réalisation de la technique et permet de gagner beaucoup de temps (Euzeby 2000 ; Liu 2006).

2.4.3. Identification génotypique

La PCR a l'habileté d'amplifier spécifiquement des cibles d'ADN présentes à faibles concentrations. Elle offre une spécificité exquise, une sensibilité sans égal, une rapidité de conduite, et une automatisation simple pour la détection de *L. monocytogenes*. Les amplifiats d'ADN produits peuvent être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, et détectés par les colorants d'ADN, par des sondes nucléiques, par séquençage, etc. L'exploitation moléculaire des différences entre les gènes ARNr 16S et 23S, des régions intergéniques : *hly*, *inlA*, *inlB*, *iap* et autres gènes a permis de différencier rapidement et précisément les espèces de *Listeria* (Graham *et al.*, 1996 ; Liu 2006).

La grande majorité des tests de PCR utilisés pour l'identification de *L. monocytogenes* utilisent les amorces de la séquence du gène *hlyA* qui code pour la listérioloysine O (LLO). *hlyA* fait partie des gènes de virulence de *Listeria* incluant les gènes : *prfA*, *plcA*, *mpl*, *actA* et *plcB* (Liu *et al.*, 2004). Bubert *et al.* (1999) ont utilisé les amorces dérivantes des régions conservées du gène *iap* (responsable de la synthèse de la protéine p60). La séparation par électrophorèse sur gel d'agarose des produits d'amplification spécifique de l'ADN a permis l'identification rapide des six espèces de *Listeria* incluant *L. grayi*.

La technique PCR-RFLP est l'amplification par PCR de un ou plusieurs gènes de virulence (exemple : *hly*, *actA* et *inlA*), suivie par la digestion par des enzymes de digestion sélectives (exemple : *HhaI*, *SacI* ou *HinI*) et séparation par électrophorèse sur gel d'agarose. L'examen des formes distinctes permet de différencier entre les sérotypes de *L. monocytogenes* (Wiedmann *et al.*, 1997).

La technique RADP-PCR est une amplification par PCR en présence d'une seule amorce correspondant à une séquence arbitraire, pour générer des trais spécifiques de fragments d'ADN anonymes. Une amorce aléatoire courte (10 à 15 bases de longueur) est utilisée dans la PCR, pour générer des produits d'amplification de formes distinctes après électrophorèse sur gel d'agarose (Liu 2006).

Le ribotypage : est une technique fondée sur le même principe que RFLP. La sonde utilisée étant une séquence d'ADN s'hybridant avec les gènes codant pour l'ARNr. C'est une technique très largement utilisée pour la caractérisation de nombreuses espèces bactériennes (Grimont et Grimont, 1986).

La technique de Détermination du profil de restriction de l'ADN après électrophorèse en champ pulsé PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis): fondée sur l'électrophorèse de gros fragments d'ADN généré après l'action d'enzyme de restriction. Cette électrophorèse s'effectue selon un procédé qui permet la migration de gros fragments d'ADN (Murchie *et al.*, 2005), la technique est l'une des plus discriminantes pour le typage de *L. monocytogenes* (Gianfranceschie *et al.*, 2009).

L'AFSSA propose les techniques suivantes pour l'isolement des *Listeria* spp. à partir des denrées alimentaires :

Méthodes normalisées : 2 méthodes de référence :

NF EN ISO 11290-1 : méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *L. monocytogenes*.

Partie 1 : méthode de recherche (+amendement du 1er février 2005 : modification du milieu d'isolement)

NF EN ISO 11290-2 : Partie 2 : méthode de dénombrement (+amendement du 1er février 2005 : modification du milieu d'isolement, de la recherche de l'hémolyse, et introduction des données de fidélité)

Méthodes validées (AFNOR) : elles appartiennent à 4 catégories :

- Celles utilisant des milieux de culture spéciaux,
- Celles mettant en œuvre la PCR,
- Celles mettant en œuvre des méthodes immunoenzymatiques,
- Celles utilisant les principes de l'hybridation moléculaire.

Le typage des souches peut se faire par sérotypage ou typage moléculaire (profil de macrorestriction d'ADN (pulsotypage) par exemple).

2.5. Epidémiologie des listérioses

2.5.1. La listériose animale

La listériose est une infection essentiellement animale, accidentellement humaine. Elle sévit de façon sporadique chez les animaux, mais peut évoluer de façon endémique dans certains élevages en fonction des techniques d'élevage. Elle semble être présente surtout dans les zones tempérées, mais on peut la rencontrer dans le monde entier. On parle de géonose ou sapronose (ou saprozoönose) : la contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion des végétaux (AFSSA, 2000).

Beaucoup d'espèces animales peuvent être infectées par *L. monocytogenes*. Néanmoins, les atteintes cliniques sont rarement rencontrées chez les ruminants provoquant des méningo-encéphalites, septicémies et avortements. L'alimentation à base d'ensilage à pH élevé contaminé par des grandes quantités de *Listeria* peu être incriminée. De plus, les *Listeria spp.* sont rarement les causes de mammites chez les vaches. Dans ces cas, la contamination du lait peu être directement due au déversement des *Listeria spp.* dans les fèces des animaux porteur asymptomatiques (Jemmi et Stephan, 2006). Brisabois *et al.* affirment que des cas de listériose humaine ont été observés chez 142 sujets en Californie (USA) en 1985 suite à une consommation du fromage mexicain "jalisco" et que 122 cas de listériose en Suisse entre 1983 et 1987 ont été dus à la consommation de "vacheron". Ils ajoutent qu'en France, 1 % à 9 % des laits crus sont contaminés par *L. monocytogenes* mais avec une concentration cellulaire faible (inférieure à 1 bactérie/mL). Cette contamination peut provenir de deux voies principales:

1. La contamination par la vache (mammites) qui est peu fréquente ; cependant le niveau de contamination est souvent élevé (1000 à 100 000 *L. monocytogenes* / mL) dans les laits de quartiers,
2. la contamination par l'environnement, plus fréquente, mais de niveau de contamination plus faibles : les ensilages de mauvaise qualité sont de ce fait une source significative de contamination car la présence de *L. monocytogenes* dans ceux-ci multiplie par 20 le risque de contamination du lait de tank.

Sont reconnues comme pathogènes, pour les animaux et surtout chez l'homme, les *L. monocytogenes*. *L. ivanovii* peut être pathogène pour les petits ruminants, particulièrement chez les ovins. *L. innocua* bien que fréquemment isolée chez des animaux présentant des signes cliniques n'est généralement pas estimée pathogène. Dans certaines exploitations, son rôle pathogène est évoqué et mériterait une réelle expertise. Les autres espèces sont *L. weslimeri* et *L. seeligeri* (AFSSA, 2000). L'évolution de la maladie varie selon la forme clinique mais dans les formes nerveuses le pourcentage de mortalité est proche de 100 (Euzéby 2000).

Les méningo-encéphalites sont une forme classique chez les adultes mais aussi chez les très jeunes animaux. Cette forme peut apparaître dans un troupeau après une série d'avortements. Après une incubation de l'ordre de 2 à 6 semaines, elles se traduisent par une prostration, un port anormal de la tête (l'animal regarde ses flancs), une marche en cercle (d'où le nom de circling disease donné à la maladie par les auteurs anglo-saxons), une perte de l'équilibre, parfois une hyperthermie, une atteinte des nerfs crâniens V, VI, VII, VIII, IX, X et XII se traduisant par une paralysie faciale et souvent unilatérale (strabisme, chute des

paupières, chute des oreilles, difficultés de mastication, dysphagie, salivation excessive, protrusion de la langue, et diminution de la sensibilité à la douleur) puis, la maladie évolue vers un décubitus et la mort. Chez les ovins et les caprins la mort intervient en 2 à 3 jours mais, chez les bovins, la durée d'évolution est plus longue (4 à 14 jours). L'atteinte du cerveau pourrait résulter soit d'une migration intra-axonale dans les terminaisons nerveuses du nerf trigéminal soit d'une dissémination par voie hématogène (AFSSA, 2000 ; Euzeby 2000).

Les septicémies sont principalement observées chez les animaux nouveau-nés et chez les jeunes mais, elles ont également été observées chez des brebis gravides. Dans ce dernier cas, les animaux présentent de la fièvre, une entérite sévère, des lésions d'ulcération sont présentes dans l'abomasum et sur la muqueuse intestinale et les plaques de Peyer présentent des abcès (AFSSA, 2000 ; Euzeby 2000).

Les avortements peuvent être dus à *Listeria monocytogenes* et, moins fréquemment, à *Listeria ivanovii*. Ils résultent d'une contamination de l'utérus gravide par voie hématogène. La durée d'incubation est de l'ordre de 5 à 12 jours, les animaux sont affaiblis, anorexiques, ils peuvent présenter de la fièvre et une diarrhée profuse mais, parfois, aucun signe clinique n'est observé. Les avortements sont tardifs, ils sont généralement sporadiques (bien que, dans certains troupeaux de petits ruminants, ils puissent concerner jusqu'à 15 p. cent des femelles gravides) et ils s'accompagnent de rétention placentaire. Des complications de mammite, de métrite puis de septicémie sont parfois observées. Lors d'une infection proche du part, on note une mortalité néonatale (AFSSA, 2000 ; Euzeby 2000).

Les mammites sont peu fréquentes et elles évoluent soit sous une forme clinique soit sous une forme sub-clinique. Dans certains cas, les animaux excrètent le germe sans présenter aucune inflammation mammaire. La présence de *Listeria monocytogenes* dans le lait constitue un danger important pour les consommateurs de lait cru ou pour la fabrication de produits au lait cru car les traitements antibiotiques sont peu efficaces et le germe est excrété dans le lait en grande quantité et durant une longue période (ainsi, une vache a excrété *Listeria monocytogenes* durant 3 lactations consécutives à des concentrations moyennes de 10^3 unités formant colonies par mL). La contamination de la mamelle résulterait soit d'une localisation secondaire soit d'une pénétration par le canal du trayon (Euzeby 2000).

La forme digestive chez certaines espèces (bovins, ovins, équins, carnivores) peut survenir, on peut observer quelquefois une entérite avant la survenue d'autres formes. Chez certaines espèces, diverses formes localisées sont observables :

- formes cutanées : carnivores, poissons ;
- formes respiratoires, mammaires (cliniques, sub-cliniques ou portage asymptomatique) : bovins, ovins, caprins, carnivores, lagomorphes, sous cutanées : lagomorphes, etc.
- formes conjonctivales, uvéites, kératites : bovins, ovins, caprins, lagomorphes, etc

Des uvéites, des kératoconjunctivites, des pneumonies, des endocardites et des myocardites ont également été décrites (Euzeby 2010).

Dans les pays de l'hémisphère Nord, de nombreux auteurs ont montré une augmentation du portage et/ou des cas en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent. La maladie sévit dans la plupart des pays industrialisés de l'hémisphère Nord où existent des

élevages intensifs ou semi-intensifs. Les espèces les plus souvent atteintes sont les ovins puis les caprins et les bovins. L'élevage peut s'effectuer en alternance sur prairies naturelles à la belle saison, en bergeries, en stabulations ou en étables l'hiver : c'est pendant cette dernière période que les cas semblent les plus fréquents. La maladie se présente aussi, sous forme de cas sporadiques dans les troupeaux. Si un ensilage est à l'origine des problèmes, l'affection peut devenir endémique dans une exploitation avec une importante mortalité. Le portage existe dans la plupart des troupeaux, à un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons (AFSSA, 2000).

2.5.2. Epidémiologie en médecine vétérinaire

Dès les années 1940 et, surtout, depuis les années 1960, le rôle des ensilages dans la contamination des ruminants par *Listeria monocytogenes* a été mise en évidence. Lors de leur préparation, les ensilages peuvent être contaminés par un faible nombre de bactéries. Le nombre de bactéries peut être très important au moment de la consommation (plus de 10^7 unités formant colonies par kg). Lorsque l'ensilage est mal conservé et/ou mal préparé (Lebres 2006).

Cette bactérie, hydro tellurique et ubiquiste, peut être hébergée, y compris de manière asymptomatique, par des mammifères (bovins, ovins, caprins, équidés, lagomorphes), des oiseaux, des poissons, des crustacés et des insectes. L'emploi saisonnier de l'ensilage comme fourrage est fréquemment suivi d'une incidence accrue de listériose clinique chez les ruminants domestiques, seules espèces extériorisant l'infection (Fosse et Magras, 2004).

2.5.3. Epidémiologie en médecine humaine

Chez l'homme, les premiers cas de listériose ont été décrits dans les années 1960 mais il fallut atteindre les années 1979-1980 pour observer les premières anadémies et mettre en évidence le rôle des aliments. En Algérie, le premier cas humain de listériose était en 1967, et par la suite approximativement moins de 10 cas ont été rapportés. Les infections humaines à *Listeria monocytogenes* sont essentiellement sporadiques (moins de 20 cas) mais elles peuvent revêtir une allure épidémique (plusieurs centaines de cas) (Sutra *et al.*, 1998 ; Fosse et Magras, 2004 ; Hamdi *et al.*, 2007)

La recherche systématique de *Listeria* a permis de montrer que de très nombreuses denrées peuvent être contaminées : végétaux (laitues, choux, céleris, concombres, champignons, pommes de terre, radis, etc.), lait et produits laitiers (fromages à pâte molle et à croûte fleurie, fromages à pâte molle et à croûte lavée, fromages à pâte persillée, fromages à pâte pressée cuite ou non cuite, pâtisseries, poudres de lait et, dans une moindre mesure, les beurres, les crèmes glacées et les yaourts) carcasses de volailles (poulets, dindes, canards), viandes de porcs, viandes de bovins, viandes d'ovins, produits carnés (plats cuisinés à base de viande, jambons cuits, rillettes, langues en gelée, saucisses de type hot-dog, saucisses à base de viande de volailles, chipolatas, merguez, saucisses de Morteau, viandes séchées, salamis, pâtés, saucissons, sandwiches au poulet, poulets frits, beignets de poulet, hamburgers au poulet, etc.), poissons et produits dérivés (saumon fumé, truite fumée, surimi, "caviar" de saumon, etc.), coquillages (huîtres, moules, coques, palourdes, etc.), crustacés (crevettes grises, crevettes roses, crabes, homards, etc.). La transmission alimentaire est bien documentée pour un certain nombre de cas sporadiques dont on estime qu'environ 33 p. cent ont une origine alimentaire. Les infections nosocomiales étant très rares, il est probable qu'il existe d'autres modes de contaminations non identifiés (Euzéby 2000).

Un certain nombre de cas de listériose échappent aux systèmes de surveillance. Ces cas peuvent être, notamment, les cas sans isolement microbiologique comme certaines rhombencéphalites ou méningites avec traitement antibiotique antérieur, les avortements précoces qui n'ont pas donné lieu à une recherche microbiologique ou des femmes enceintes fébriles qui n'ont pas eu d'hémoculture (AFSSA 2000).

A la différence de certaines autres infections transmises par les aliments, il n'existe pas de saisonnalité mensuelle qui apparaisse nettement en matière de listériose humaine. La distribution des cas par trimestre montre toutefois une augmentation d'importance variable pour le 3ème trimestre pour les pays industrialisés de l'hémisphère Nord.

Selon les pays, le recensement des cas est soit fondé sur les déclarations de cas par les médecins, soit sur le nombre de souches de *L. monocytogenes* isolées par les laboratoires de leur pays, soit une combinaison des deux sources d'information. Certains pays ne recensent que certaines formes cliniques de listériose : méningites ou infections néo-natales (AFSSA 2000).

Le souci majeur reste la gestion du risque *Listeria*. En effet, toutes les inquiétudes convergent vers l'adoption d'une stratégie défavorisant l'atteinte par la bactérie surtout au moment de la consommation. Le développement de stratégie anti-*Listeria* doit passer par un programme d'épidémiologie-surveillance pour mettre en place les mécanismes de contrôle et de gestion des risques afin d'obtenir des informations sanitaires fiables qui servent aux services vétérinaires à prendre des décisions pertinentes dans la lutte contre les maladies animales. Les informations récoltées doivent être sous forme d'enregistrements continus permettant de suivre l'état de santé ou les facteurs de risque d'une population définie, en particulier pour déceler l'apparition de processus pathologiques et d'en étudier le développement dans le temps et dans l'espace, en vue de l'adoption de mesures de lutttes appropriées.

Pour Crerar *et al.* (2011), les facteurs qui favorisent la listériose en Nouvelle Zélande suite à la contamination des produits prêts à la consommation (PPC) se résument dans l'âge des consommateurs et les composantes principales de leur stratégie anti-*Listeria* sont :

- Catégoriser les PPC afin de focaliser les produits à très haut risque,
- Déterminer des directives pour des actions correctives applicables à tout le secteur agroalimentaire,
- Développer des directives pour mieux assister les opérateurs de l'agroalimentaire afin de les aider à développer des contrôles appropriés des aliments, en incluant des programmes de formation et de recyclage,
- Développer des directives pour les consommateurs pour leur permettre de rester informés à propos des PPC à haut risque, leur conservation, leur préparation et leur consommation.

2.5.4. Contamination et transmission

La listériose ne répond pas à la description de l'empoisonnement alimentaire et son origine alimentaire n'est toujours pas facile à démontrer. On rencontre les *Listeria* chez les animaux qui peuvent présenter des signes d'infection (mammites chez les bovins) ou être des porteurs sains. Pourtant, cette maladie peut être fatale, et la nourriture semble bien être la source principale d'infection. Le fait que certaines souches ne soient que faiblement pathogènes ou même non pathogènes empêche une évaluation précise du risque de la listériose (Guiraud 1998 ; Singleton 1999).

Alors que les résultats d'enquêtes épidémiologiques réalisées au début des années 90 sur l'origine de la contamination du lait de vache par *L. monocytogenes* (Sanaa 1993 ; Sanaa *et al.*, 1993 ; Sanaa *et al.*, 1996) montrent que la contamination du lait est d'origine environnementale dans près de 95 % des cas. Cette origine se manifeste généralement par une contamination peu fréquente et irrégulière (en moyenne, moins de 2 contrôles positifs par an), avec des concentrations faibles en *L. monocytogenes* (moins de 1 UFC/ml).

Les principales sources de contamination sont la peau des trayons, et plus en amont les fèces et les ensilages de mauvaise qualité, dans lesquels on peut trouver des concentrations de *L. monocytogenes* très élevées (respectivement plus de 10^5 , et plus de 10^7 bactéries/g). Les principaux facteurs de risque associés à la contamination du lait, évalués à partir d'une enquête cas-témoin, sont les ensilages mal confectionnés et mal conservés, de mauvaises conditions d'hygiène dans les étables ou pendant la traite, et des pratiques incorrectes de nettoyage et de désinfection du matériel de traite (figure 4). Ces résultats suggèrent que le schéma de contamination du lait est le suivant:

- contamination des fourrages lors de la confection des ensilages, et multiplication en cas de mauvaise conservation,
- ingestion de fourrage contaminé et excrétion fécale de *Listeria* par les vaches laitières,
- contamination des litières par les fèces, puis contamination de la peau des trayons,
- nettoyage insuffisant ou inefficace des mamelles et passage des *Listeria* dans le lait lors de la traite.
- mauvaises conditions d'hygiène : fréquence insuffisante de nettoyage des aires d'exercice et de renouvellement des litières, hygiène insuffisante de la traite.
- La présence de *L. monocytogenes* dans le lait cru peut aussi avoir une origine des infections mammaires dues à ce germe. Ces infections sont rares mais peuvent entraîner une contamination massive du lait de troupeau (moins de 10% des élevages étudiés, et 0,2% des animaux prélevés (Sanaa 1993 ; Sanaa *et al.*, 1993; Sanaa *et al.*, 1996 ; Sutra *et al.*, 1998).

Dans les fermes laitières, le lait cru peut être contaminé par les fèces. Les études ont confirmés la relation entre la faible qualité de l'ensilage et la présence de *Listeria* dans les fèces. *L. monocytogenes* est l'un des facteurs impliqués dans le développement des mammites bovines. Cependant, les cas de mammites reliés aux infections à *L. monocytogenes* sont rares. Dans le cas de la mammite, le lait contient 2000 à 20000 bactéries/ml. Donc, à l'exception des mammites bovines, la procédure de traite représente une source potentielle de contamination du lait cru. Le lait peut être contaminé à partir des pis sales, les tétés, les mains humaines et l'équipement (Sanaa *et al.*, 1993).

L'ensilage, la méthode traditionnelle de conservation du fourrage (et de certains autres produits agricoles), permet de nourrir le bétail pendant les mois d'hiver lorsque la végétation est relativement rare. Elle consiste essentiellement à stocker le fourrage finement coupé dans des conditions anaérobies et à le laisser fermenter. Il y a des bactéries (par exemple *Lactobacillus spp.*), sur les végétaux et/ou dans l'enceinte de stockage (le silo) qui métabolisent les sucres des plantes (comme le fructose, le glucose, le saccharose) principalement par fermentation lactique. L'acide lactique produit abaisse rapidement le pH (à 4,0 environ), inhibant ainsi des organismes (en particulier *Clostridium spp.*) qui, sans cela, provoqueraient de la putréfaction. Ces activités fermentatives contribuent à conserver la valeur nutritive des produits agricoles. L'acidité aide aussi à inhiber la croissance de *L. monocytogenes*, organisme capable de croître en ensilage incomplètement fermenté dont le pH est supérieur à 5,5 (Singleton 1999).

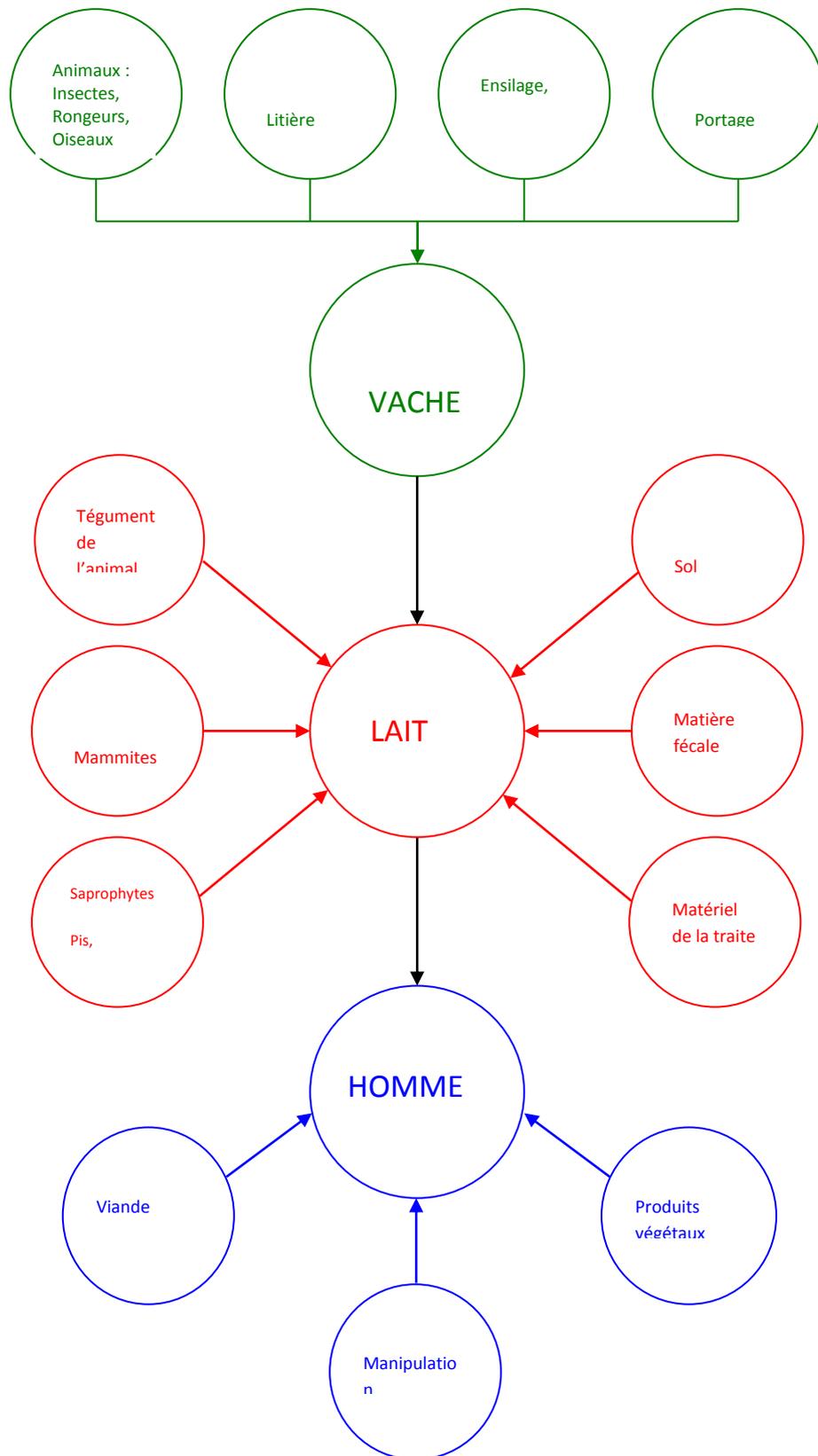


Figure 4 : Contamination et transmission de *Listeria* dans le lait.

2.6. Ecologie et habitat

L. monocytogenes est présente dans l'environnement. On peut dire qu'elle n'est qu'accidentellement pathogène pour l'homme et les animaux. Son biotope naturel est le sol, où elle se développe en saprophyte sur des végétaux en décomposition, et elle est capable de survivre plusieurs mois voire plusieurs années. La durée de survie dépend des caractéristiques physico-chimiques et du taux d'humidité du sol. Elle est principalement rencontrée dans les aliments végétaux crus et les produits à base de lait cru, mais tous les types de denrées peuvent être contaminés comme en témoignent les épidémies récentes dues à des produits de charcuterie. Donc, les animaux fermiers et leur environnement peuvent présenter une importante source de contamination de l'aliment et d'infections pour l'homme (Sutra *et al.*, 1998 ; Bornert 2000 ; Jemmi et Stephan, 2006).

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

L. monocytogenes est rencontrée dans l'eau et également dans le tube digestif de nombreux animaux. On la trouve aussi dans les matières fécales et les ensilages et elle est susceptible de contaminer les aliments. Le portage intestinal asymptomatique de *L. monocytogenes* est relativement fréquent aussi bien chez l'homme (5 à 10% des individus) que chez les animaux d'élevage (par exemple de 10 à 15% chez les bovins). *L. monocytogenes* est capable de survivre très longtemps dans les fèces d'animaux (entre 6 mois et plus de 5 ans). Les matières fécales animales ou humaines représentent donc une source de contamination de l'environnement naturel (sol et eaux) (Anonyme, 2003 ; Guiraud 1998 ; Singleton, 1999; Sutra *et al.*, 1998).

Les *Listeria spp.* sont des bactéries résistantes dans le milieu extérieur (survie de 1 à 2 ans dans le sol, 21 mois dans du lait naturellement contaminé, 1 à 18 mois dans les fèces, 6 mois dans la paille), très largement répandues dans l'environnement (sols, végétaux, pâtures, eaux douces, eaux de mer, vase, eaux d'égouts), dans les locaux d'élevage (litière, sol, parois, fenêtres, mangeoires, abreuvoirs, etc.) et dans les locaux d'habitation (torchons, serpillières, périphérie des conduites d'évacuation, réfrigérateurs et même brosses à dents) (Euzéby 2000).

Les ensilages sont connus depuis longtemps pour jouer un rôle important dans l'apparition de la listériose dans des troupeaux de ruminants alimentés de cette façon. Cette affection a été rapidement appelée la « maladie de l'ensilage », pour laquelle de nombreux facteurs semblent intervenir entre autre le type de silos, la qualité de fabrication de l'ensilage et les conditions de stockage.

S'agissant du type de silos : le sol étant le réservoir initial de *Listeria*, si l'ensilage est en contact direct avec la terre ou que cette dernière se retrouve à l'intérieur de la masse végétale, la contamination par les *Listeria* risque d'être importante (cas des silos « taupes » non bétonnés rencontrés dans certaines régions)

Pour la qualité de fabrication de l'ensilage : un ensilage bien fait aura rapidement un pH compris entre pH 3 et pH 4 empêchant la multiplication bactérienne et pouvant même favoriser l'élimination de bactéries préexistantes dont *Listeria*. Par contre, si l'ensilage a un pH supérieur à pH 4, il peut y avoir survie de *Listeria* et même multiplication de ces bactéries (AFSSA, 2000).

Enfin, un ensilage peut avoir été bien préparé mais maintenu dans de mauvaises conditions d'anaérobiose, du fait, par exemple, de l'emploi de bâches de mauvaise qualité, de récupération, percées ou mal installées à la surface de l'ensilage. Dans ces conditions, la fermentation lactique ne sera pas suffisante dans certaines zones (dessus du silo et côtés pouvant être en contact avec l'air ou la terre), et le pH augmentera, permettant la multiplication bactérienne. Ainsi des taux de *Listeria* très élevés pourront être atteints, entre 10^2 UFC/g et 10^6 UFC/g. Des études effectuées sur des échantillons d'ensilage prélevés à différents pH montrent une élévation progressive des échantillons contaminés : de 17 % à un pH voisin de pH 4 à 72 % un pH supérieur à pH 6.

Les animaux sauvages (micro-mammifères, oiseaux) peuvent être porteurs de *Listeria* dont *L. monocytogenes*. Ils peuvent contaminer les silos, coloniser les ensilages, percer les bâches et, par conséquent, jouer un rôle dans la multiplication et la dissémination des *Listeria*. Certains auteurs n'hésitent pas à dire que ces vecteurs jouent un rôle très important et que les épidémies de listérioses observées dans certains élevages sont liées à leurs cycles de reproduction. Cette hypothèse serait intéressante à vérifier puisque dans des régions à élevages traditionnels sans ensilage, des foyers sporadiques de listériose surviennent chez des animaux en pâtures naturelles dont le sol est envahi par des campagnols ou des « rats taupiers » (AFSSA, 2000).

De très nombreuses interactions antagonistes de *L. monocytogenes* ont été décrites *in vitro* ou encore dans des produits laitiers et carnés à l'échelle du laboratoire. La plupart font appel à l'action de bactériocines produites par des ferments lactiques ou par des ferments d'aromatisation. Parmi les bactériocines, la nisine, est la plus anciennement connue et son efficacité prouvée dans des fromages. De nombreuses autres bactériocines ont été décrites depuis 20 ans : lacticine, helveticine, sakacine, divercine, piscicocine, pediocine, carnicine, linenscine. Toutes ou presque sont efficaces *in vitro* ou dans des fabrications expérimentales à l'échelle du laboratoire. Il semble que quelle que soit la bactériocine considérée, des résistances croisées aux bactériocines puissent apparaître rapidement. D'autres travaux existent et montrent qu'il n'y a pas d'apparition de résistance croisée lorsque les bactériocines considérées sont de classes différentes. Par ailleurs différentes observations d'industriels laitiers vont en ce sens mais n'ont pas été publiées (AFSSA, 2000).

Indépendamment des bactériocines, des phénomènes de compétition ont été décrits, où intervient l'effet inhibiteur propre d'acides organiques issus de la fermentation des sucres ou du pH final des produits. Certaines espèces de staphylocoques, en particulier *Staphylococcus sciuri*, semblent freiner la colonisation des surfaces par *Listeria* sous forme de biofilms; ces effets auraient pour origine la production par ces bactéries de surfactants inhibant partiellement l'adhésion de *L. monocytogenes* à la surface des environnements de fabrication. Un effet inhibiteur de *L. innocua* sur *L. monocytogenes* est lié à une production de bactériocine, ou plus vraisemblablement des particules phagiques (AFSSA, 2000).

Récemment, il a été fait état de l'existence de molécules à activité anti *Listeria* produites par *Geotrichum candidum* en milieu liquide et solide. L'inhibition exercée par cette moisissure semble liée à la production de précurseurs de la phénylalanine et du tryptophane très stables à la chaleur (120°C, 20 min) (AFSSA, 2000).

3. BIOLOGIE MOLECULAIRE ET PHYLOGENIE DE *Listeria spp.*

3. 1. Structure du génome de *Listeria spp.*

Le premier séquençage complet du génome de *L. monocytogenes* a été déterminé par un consortium européen en 2001, au même moment que *L. innocua* (Baquero *et al.*, 2001). Hain *et al.* (2006) ont rapporté la séquence complète du génome de *L. welshimeri*. Ils ont aussi comparé cette séquence aux séquences complètes du génome de 3 souches de *Listeria* : *L. monocytogenes* 1/2a EGD-e, *L. monocytogenes* 4b F2365, et *L. innocua*. L'ensemble des caractéristiques de *L. welshimeri* et les séquences récentes de *L. monocytogenes* et *L. innocua* sont données dans le Tableau 8 :

Tableau 8 : Caractéristiques biomoléculaires de *L. welshimeri*, *L. innocua*, et *L. monocytogenes* (Hain *et al.*, 2006)

Caractéristiques	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. monocytogenes</i> EGD-e
Taille du chromosome (pb)	2 814 130	3 011 208	2 944 528
Contenu G + C (%)	36,4	37,4	38,0
Contenu G + C (%) des gènes codant pour les protéines	36,7	37,8	38,4
Nombre total des gènes codant pour les protéines	2 780	2 981	2 855
Longueur moyenne (codons) des gènes codant pour les protéines	299	300	307
Nombre d'opérons ARNr (16S-23S-5S)	6	6	6
Nombre de gènes ARNt	66	66	67
Pourcentage codant	88,7	89,2	89,2
Nombre de prophages	1 (55 gènes)	5 (305 gènes)	1 (62 gènes)
Nombre de plasmides	0	1	0
Nombre de gènes spécifiques à la souche ^a	311	121	218
N° de gènes orthologues ^a	2,414	2,555	2,575
Nombre de transposons	0	0	1

^a A l'exception des gènes prophages

Le génome de la souche EGD-e de *L. monocytogenes* contient 2853 gènes codant des protéines. La séquence de trois autres souches cliniques ont ensuite été déterminées à l'Institut de Recherche en Génomique en 2004. Leur comparaison (bioinformatique) avec la souche EGD-e a révélé que l'organisation du génome est hautement conservée entre les souches, avec un grand nombre de gènes orthologues (Cossart, 2009).

Le génome circulaire de la souche *L. welshimeri* (SLCC5334) est d'une longueur de 2814130 bp (Figure 7). Par comparaison aux tailles des génomes de *L. monocytogenes* et *L. innocua*, *L. welshimeri* possède le génome le plus petit du genre *Listeria*. De même, *L. welshimeri* a le contenu G + C (36,4%) légèrement inférieur à celui de *L. monocytogenes* (38,0%) et *L. innocua* (37,4%). Le génome de *L. welshimeri* contient six copies complètes des opérons ARNr (16S-23S-5S) ; deux sont localisées à droite de la représentation et

quatre sont à gauche (Figure 5). Soixante six gènes ARNt ont été détectés. Ce nombre est similaire à celui de *L. innocua*, cependant il est inférieur à celui de *L. monocytogenes* (Hain *et al.*, 2006).

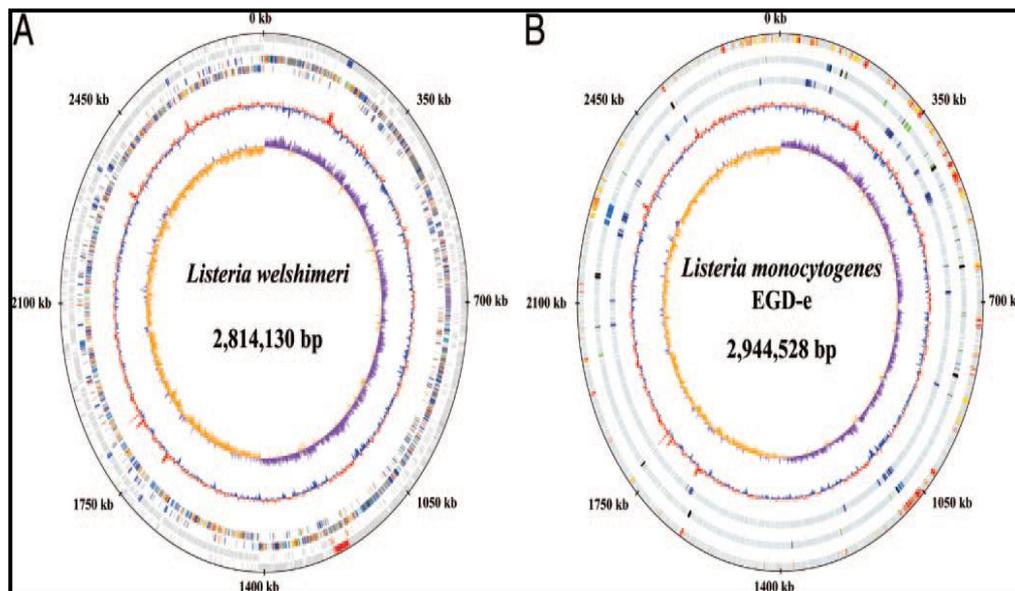


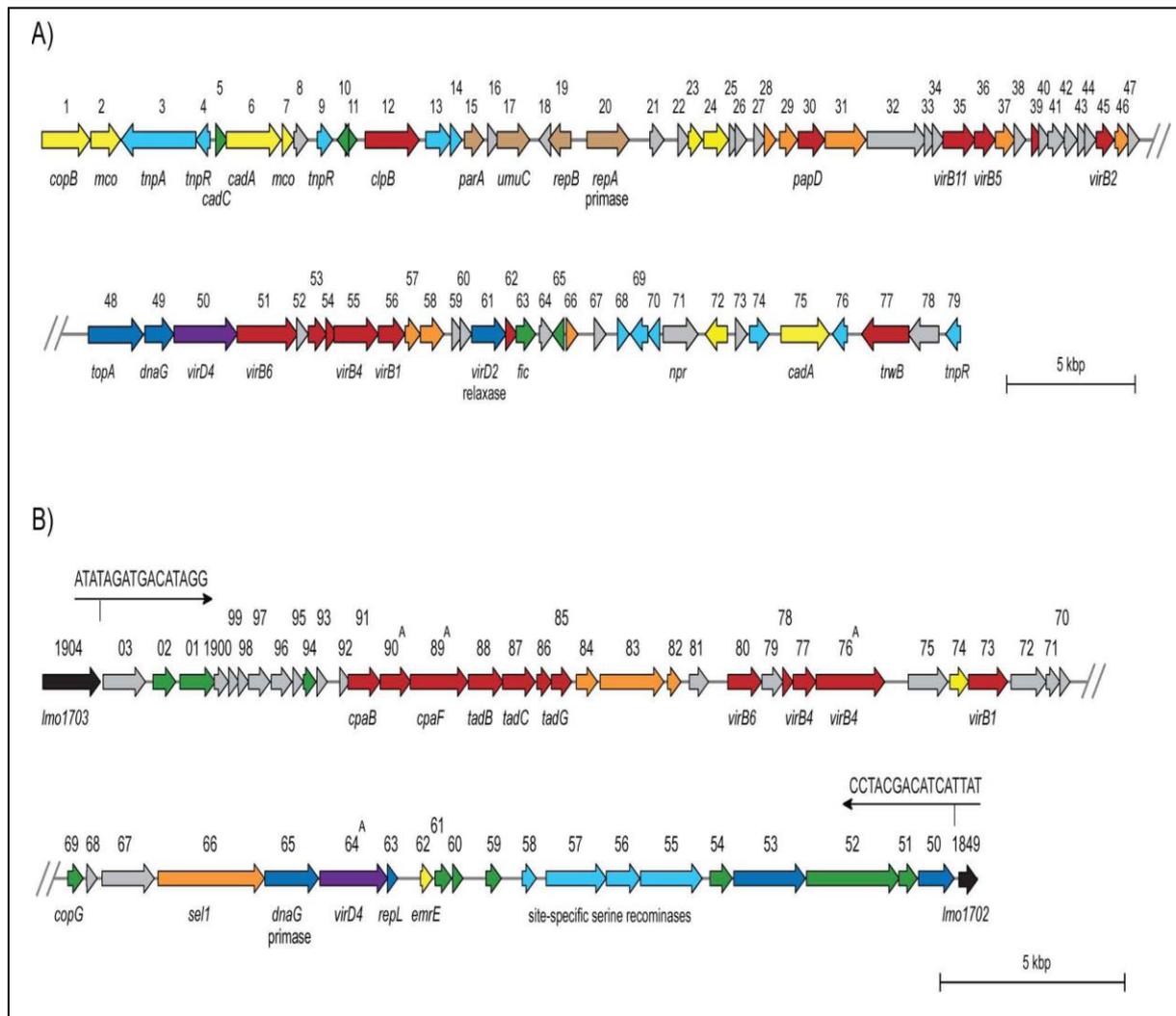
Figure 5 : (A) Représentation circulaire du génome de *L. welshimeri* (Hain *et al.*, 2006). Le premier cercle représente l'échelle en kilobases débutant par l'origine de la réplication en position 0. Le deuxième cercle montre la distribution de CDS (CDS : Protein coding sequences) en gris, en premier et en arrière plan. Les opérons ARNr sont colorés en bleu, une région de prophage en rouge et les ARNt en magenta. Le troisième cercle indique les regroupements des orthologues (COG : Clusters of orthologous groups). Le quatrième cercle indique l'écart du contenu moyen en GC, avec les valeurs supérieures à zéro en rouge et ceux inférieurs à zéro en orange. Le cercle le plus profond montre le GC skew ($([G + C] / [G - C])$), avec les valeurs supérieures à zéro en pourpre et ceux inférieurs à zéro en orange. La figure a été générée en utilisant le programme GenomeViz (Ghai *et al.*, 2004).

(B) Identification des régions éliminées de *L. welshimeri* et *L. innocua* dans les positions correspondant au génome de *L. monocytogenes* EGD-e (Hain *et al.*, 2006). Le premier cercle représente l'échelle en kilobases débutant par l'origine de la réplication en position 0. Le deuxième cercle montre la distribution de CDS dans *L. monocytogenes* (gris). Les gènes colorés sont ceux enlevés chez *L. welshimeri* et *L. innocua* par comparaisons aux gènes de *L. monocytogenes* EGD-e : en rouge, suppression commune dans les deux souches non pathogènes ; en jaune, suppression spécifique chez *L. welshimeri* ; et en orange, suppression spécifique chez *L. innocua*. Le troisième cercle indique la localisation des gènes codants pour les internalines (vert), les protéines LPXTG (noir), et les protéines phagiques, les pseudogènes, les gènes de transposases et intégrase (bleu). Le quatrième cercle montre les gènes étrangers (bleu clair) identifiés par SIGI (Merkl *et al.*, 2004). Le cinquième cercle indique l'écart dans le contenu GC, avec les valeurs supérieures à zéro en rouge et ceux inférieurs à zéro en bleu. Le cercle le plus profond montre le GC skew ($([G + C] / [G - C])$), avec les valeurs supérieures à zéro en pourpre et ceux inférieurs à zéro en orange. La figure a été dessinée en utilisant GenomeViz software (Ghai *et al.*, 2004).

Steinweg *et al.* (2010), ont rapporté la séquence complète du génome de l'espèce non pathogénique *L. seeligeri*. Le génome consiste en un chromosome circulaire de 2797636 pb plus petit que celui des souches de *Listeria* séquencées auparavant. *L. seeligeri* n'héberge pas

de plasmide, porte seulement une copie de prophage et aucun transposon dans son génome. La moyenne de G + C contenu dans *L. seeligeri* est de 37,4%, qui est proche de la valeur moyenne connue pour les souches de *Listeria*. Six opérons ARNr 16S-23S-5S ont été identifiés. Sont tous localisés en premier plan, deux sur la droite et quatre sur la gauche du génome. De plus, 67 gènes ARNt ont été détectés.

Gilmour *et al.* (2010) ont décrit la nouveau îlot génomique de *Listeria* de 50 kb (LGI1 : *Listeria* genomic island) de *L. monocytogenes* 08-5578 et le plasmide pLM5578 (Figure 6).



Réplication / Partitionnement	Protéine Surface/ membranaire	Processus d'ADN	Transport extracellulaire	Fonction inconnue
Régulation	Canal membranaire / Pili	Couplage Type IV (T4CP)	Transposition	Domaine ATPase A

Figure 6: Organisation génétique et fonctions prédictives de pLM5578 (A) et l'îlot génomique 1 de *Listeria* (LGI1) (B). Les deux séquences représentent des régions génétiques continues, elles sont coupées en deux lignes pour facilité la visualisation, avec les sites de

segmentation artificiels dénotés en lignes angulées. Les locus tag sont indiqués au-dessus de la carte CDS et les noms des gènes (en italique) au-dessous. Les séquences codantes sont colorées en se basant sur les fonctions prédictives avec légende inset. Les séquences codantes colorées en noir sont similaires à celles de *L. monocytogenes* EGDe (locus tags, lmo) et les séquences inversées répétées de 16 pb délimitant l'île génomique sont indiquées. Une échelle pour l'estimation de la taille des nucléotides est incluse (Gilmour *et al.*, 2010). (pLM5578 : plasmid, LGI1 : *Listeria* genomic island 1)

3.2. Les gènes de *Listeria* spp.

Le genre *Listeria* contient deux espèces pathogènes : *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*, et quatre espèces non pathogènes : *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, et *L. grayi*. La pathogénicité des deux espèces est permise par un cluster de gènes de virulence d'environ 9 kb, qui est présent en une forme modifiée chez *L. seeligeri* (Schmid *et al.*, 2005).

Le déterminant majeur de la virulence de *Listeria* est localisé sur le regroupement des gènes de virulence *vgc* (virulence gene cluster) ou îlot de pathogénicité de *Listeria* LIPI-1 (*Listeria* Pathogenicity Island 1) qui est responsable du cycle de vie intracellulaire de la bactérie (Chakraborty *et al.*, 2000 ; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Tous ces gènes de virulence sont absents chez *L. welshimeri*, ce qui suggérerait que le genre *Listeria* c'est probablement développé par la perte de la région *vgc* conduisant à une génération d'espèces non pathogènes à partir d'une souche ancêtre abritant les gènes de virulence (figure 9).

Les fonctions de virulence de *L. monocytogenes* sont codées par six gènes portés par le cluster LIPI 1 (Vazquez-Boland *et al.*, 2001 ; Kreft *et al.*, 2002).

Selon Schmid *et al.* (2005), le cluster de virulence de *L. monocytogenes* et *L. ivanovii* contient les gènes (figure 7):

- *prfA* qui code pour la régulation des gènes de virulence.
- *hly* qui code pour la listériolysine nécessaire à l'échappement des phagosomes des cellules hôtes.
- *plcA* et *plcB* codent pour deux phospholipases facilitant la lyse des membranes des cellules hôtes.
- *mpl* code pour une métallo-protéase nécessaire pour la lécithinase.
- *actA* code pour l'actine responsable de la mobilité intracellulaire, et permis aussi, en association avec les gènes *mpl* et *plcB* le déplacement de cellule en cellule.

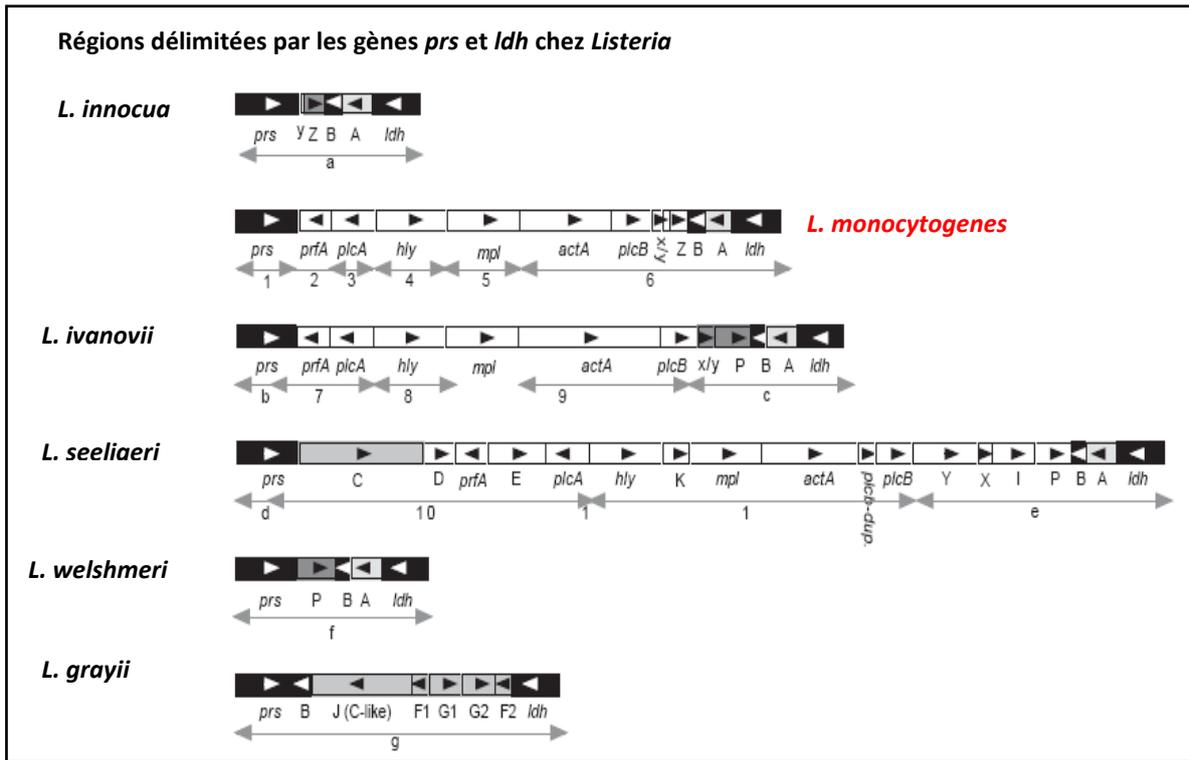


Figure 7 : Diagramme schématique du cluster de virulence (*vcl*), avec les noms appropriés des séquences. Ce cluster est délimité par les gènes *prs* et *ldh* (boîtes noirs) dans les six espèces du genre *Listeria*. Les gènes sont contrôlés par le régulateur *PrfA* montré en boîtes blanches (Schmid *et al.*, 2005). *vcl* : virulence cluster locus, *prs* : gène codant pour la phosphoribosyl pyrophosphate synthétase (318 acides aminés chez *L. monocytogenes*), *ldh* : gène codant pour la lactate déshydrogénase (environ 310 acides aminés).

En plus du cluster des gènes de virulence, d'autres gènes ont été identifiés et localisés ailleurs sur le génome de *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*. La plupart de ces gènes constituent une famille dénommée internalines codant pour des protéines extracellulaires longues de 22 acides aminés riches en Leucine (LRRs : leucine-rich repeats). Quelques internalines sont nécessaires pour l'invasion des cellules mammaliennes hôtes (Dramsı *et al.*, 1997). Le gène *InlA* (début : 454534, fin : 456936) code une protéine IntA de 800 AA (88 KDa) appartenant à la famille des internalines qui comporte les internalines A, B, C, D, E, F, G, H et J. Elle est organisée en plusieurs domaines fonctionnels (Cabanés, 2004), (figure 8) :

1. un peptide signal (P),
2. une région de 15 répétitions de 22 AA riches en leucine (LRRs),
3. une région inter-répétition (IR),
4. une région (B) de trois répétitions de deux fois 70 et 49 AA,
5. une région (PA) de pré-ancrage sur la surface cellulaire hôte,
6. un domaine C-terminal contenant le motif LPXTG.

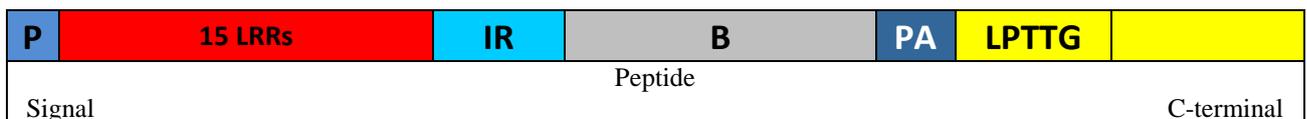


Figure 8 : Représentation schématique de l'*InlA* (Cabanés, 2004).

L'*InlA* est une protéine de surface maintenue par une liaison covalente de son motif d'ancrage LPXTG au peptidoglycane. L'*InlA* favorise l'entrée de la bactérie dans les cellules

hôtes et joue un rôle dans l'invasion des cellules épithéliales par leur interaction avec le récepteur E-cadherin qui est une molécule de jonctions adhérentes située sur la face basolatérale des cellules épithéliales polarisées.

La région LRRs de l'InlA interagit avec le premier ectodomaine (EC1) de la E-cadherin conduisant à l'adhésion bactérienne ; cependant l'entrée dépend du domaine intracytoplasmique de la E-cadherin.

La spécificité de cette interaction (InlA/E-cadherin) est très étroite. Ainsi, la N-cadherin neurale ne fixe pas l'InlA. De plus, l'interaction InlA/E-cadherin requiert la présence d'un résidu proline en position 16 dans la E-cadherin. Celui-ci est absent dans le cas de la E-cadherin murine qui possède un résidu glutamique à la place de la proline en position 16 (Herro, 2006).

D'autre part, il y'a une protéine associée à l'invasion (IAP : Invasion Associated Protein) nommée aussi P60 reflétant sa taille moléculaire de 60 kDa. Elle est codée par le gène *iap* et impliquée dans le phénomène d'invasion (Schmid *et al.*, 2005).

Olesen *et al.* (2010), dans leur étude, ont investigué la transcription relative des deux gènes de virulence (*prfA*, *inlA*) et de deux gènes de virulence et de réponse au stress (*sigB*, *clpC*) pour trois souches de *L. monocytogenes*, avec trois niveaux de tolérance à l'NaCl et un choc à froid. Il a été démontré que l'exposition au choc à froid (30 min) augmente l'activité de la transcription du facteur σ^B codé par le gène *sigB* (Kazmierczak *et al.*, 2003 ; Chan *et al.*, 2007). La même étude a aussi démontré que la transcription partielle du facteur σ^B est régulée par le gène de virulence *bsh* durant le choc à froid.

3.3. Régulation biomoléculaire de la virulence de *L. monocytogenes*

L'analyse du génome de *L. monocytogenes* a révélé l'existence de plus de 200 gènes codant pour des protéines régulatrices putatives (soit 7% du génome total). Elle occupe ainsi la deuxième place après *Pseudomonas aeruginosa* (8,4%).

Les facteurs de virulence sont codés par des gènes situés sur un même locus de 9Kb (îlot de pathogénicité ou LIPI-1, voir figure 9), (Schmid, 2005):

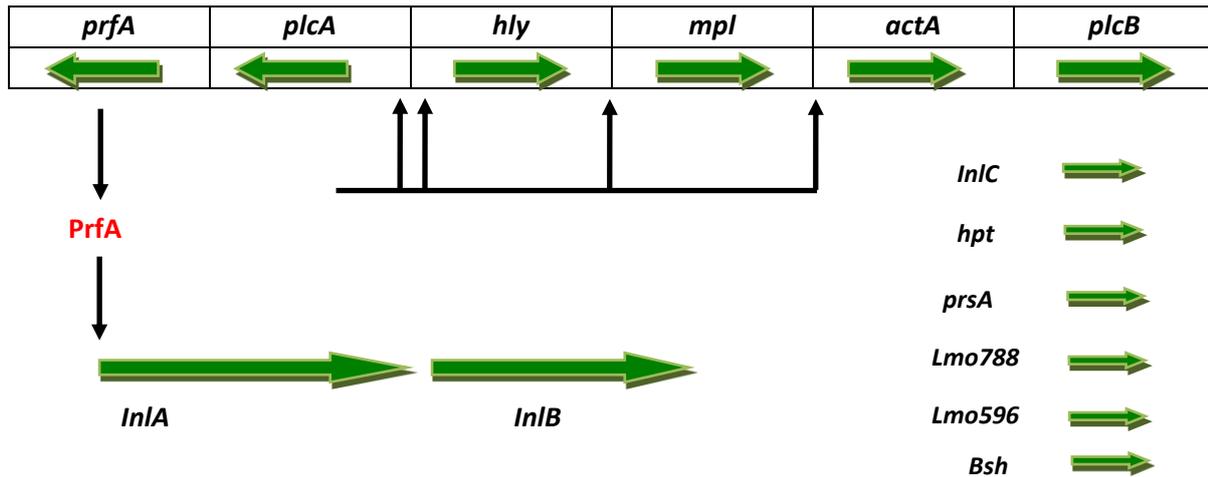


Figure 9 : Schéma des principaux gènes de virulence de *L. monocytogenes* régulés par PrfA (Schmid, 2005).

PrfA ou Positive regulatory factor A (famille des régulateurs transcriptionnels Crp/Fnr) active la transcription des gènes codant les principaux facteurs de virulence tels que *inlA*, *inlB*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *hpt* et *bsh*. Trois groupes de gènes sont différemment régulés par PrfA :

- le groupe I : comprend 12 gènes positivement régulés par PrfA, dont 10 codent des facteurs de virulence,
- le groupe II : comprend 8 gènes régulés négativement,
- le groupe III : comprend 53 gènes dont certains sont précédés d'une boîte σB .

Schématiquement (figure 10), il est possible de représenter le mécanisme et les molécules impliquées dans la physiopathologie lors de l'invasion de la cellule hôte par *Listeria* :

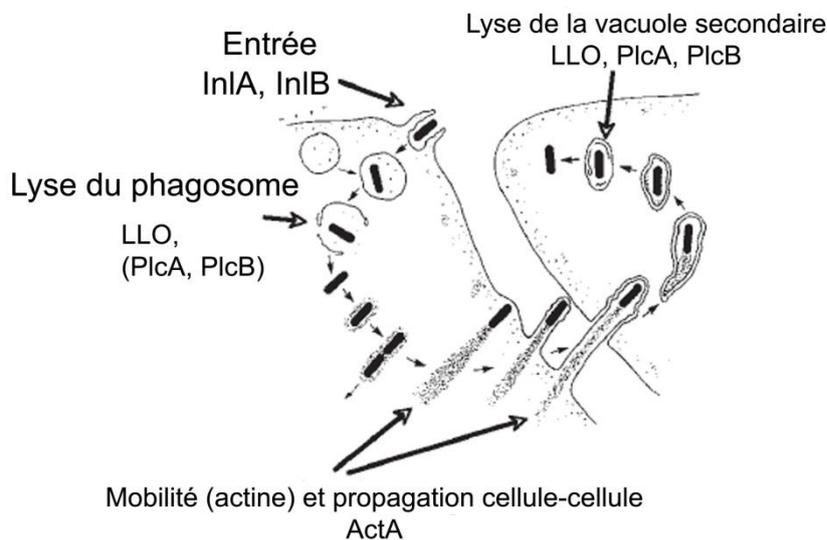


Figure 10 : Mécanisme de l'invasion cellulaire par *Listeria spp.*

3.4. Construction d'arbres phylogénétiques

Au départ fût la généalogie. C'est Lamarck qui en conçut les fondements évolutifs. (1809). Selon lui, la généalogie est une construction qui doit exprimer "*l'ordre représentant le plus possible celui même de la nature, c'est-à-dire l'ordre qu'elle a suivi dans la production des animaux et qu'elle a éminemment caractérisé par des rapports qu'elle a mis entre les uns et les autres*". Ce terme a été transformé par la suite par le terme "phylogénie" pour la première fois par Ernst Haeckel en 1866. Il définit par ce nouveau terme l'enchaînement des espèces au cours du temps.

Dans "L'origine des espèces", Charles Darwin (1859), introduisit ce mot qui désignait selon lui : les lignes généalogiques de tous les êtres organisés.

Actuellement, la définition de la phylogénie la plus appropriée serait "*le cours historique de la descendance des êtres organisés*". Cependant, les constructions phylogénétiques (dendrogrammes) peuvent également concerner les individus actuels sur lesquels portent les recherches de la systématique pour mettre en évidence les similarités qui peuvent exister entre les individus analysés (Darlu et Tassy, 1993).

Pour ce faire, le chercheur biologiste doit disposer d'un ensemble de données qui représentent les informations suivantes :

- **Informations phénotypiques** : C'est l'ensemble des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques. Dans ce cas, l'arbre obtenu est un **phénogramme** construit à partir des similitudes entre les différents individus (taxons) calculées selon un coefficient de similarité (par exemple le coefficient de Jaccard). La matrice de similitude va permettre un calcul de la matrice des distances avec laquelle l'arbre est construit. Plus le nombre de caractères analysés est élevé et plus les relations phylogénétiques entre les individus sont mieux exprimées.
- **Informations moléculaires** : séquences nucléotidiques (ARN 16S, gènes spécifiques comme c'est le cas du gène de la protéine cytochrome oxydase de la chaîne respiratoire, etc.) ou protéiques (comme les systèmes enzymatiques par exemple) : Il faut dans ce cas réaliser un alignement multiple des séquences (nucléiques ou protéiques) provenant des différents individus avec le programme informatique ClustalW2 disponible sur la banque EMBL (ou un autre logiciel comme MEGA 4.0 du pôle bioinformatique lyonnais ou MultiAlign qui sont tous libres de droits). Cet alignement multiple va permettre de calculer une matrice de distances qui sera utilisée pour construire l'arbre qui, dans ce cas est appelé **phylogramme**. Ce stade d'analyse constitue la pierre de Rosette des génomistes : La génomique comparative.
- **Informations chimiques** : acides aminés des structures et pariétales, esters d'acides gras, etc. Cet ensemble d'informations, en plus des techniques d'hybridation moléculaire (ADN/ADN, ADN/ARN plus stables) vient corroborer les observations et les résultats fournis par les arbres phylogénétiques préalablement construits. C'est la phylogénie polyphasique.

3.4.1. Choix des gènes cibles

Dans le cas des données moléculaires, quelles séquences aligner ?

Le clonage et le séquençage de l'ARN 16S par PCR à partir d'échantillons environnementaux a rendu possible l'étude de la biodiversité microbienne sans passer par la très contraignante étape de mise en culture (Amann *et al.* 1995). Cette technique appliquée à l'étude d'environnements très divers, depuis les sources hydrothermales jusqu'au tube digestif des mammifères, a permis la découverte d'un très grand nombre d'espèces nouvelles à la fois chez les Bactéries, les Archéobactéries et les Eucaryotes (Filee, 2002).

- L'ARNr 16S

Il constitue un excellent outil et un chronomètre de l'évolution moléculaire. Il contient plusieurs régions dans lesquelles la séquence nucléotidique est fortement conservée chez toutes les cellules. Il existe une base de données sur Internet qui contient des séquences des ARNr. On peut, à ce propos consulter le projet RDP² (Ribosomal Database Project) qui propose une collection d'au moins 100 000 séquences en plus des informations phylogénétiques, de références bibliographiques et des séquences nouvellement établies (Madigan et Martinko, 2007). A l'origine, le choix de la molécule ARNr 16S ou 23S pour des études phylogéniques, fut déterminé par des raisons techniques. La taille plus importante et la présence de structures secondaires particulièrement marquées dans l'ARNr 23S ont longtemps rendu son clonage et son séquençage difficiles. Pour ces raisons, l'ARNr 16S a été choisi comme index phylogénique et en particulier pour la phylogénie des procaryotes. Ceci a permis la construction de la plus grande banque de données actuelle avec un rythme d'accroissement supérieur à celui de toutes les autres molécules. C'est donc le gène classique pour ce genre de travail et pour les seules *Bacteria*, on dispose (en septembre 2005) de plus de 174 000 séquences (Croce 2005).

L'ARN 16S a une structure particulière faite d'une succession de domaines dont les vitesses d'évolution sont très variables, de relativement élevée à presque nulle. Chacun de ces domaines a son importance pour l'identification moléculaire des micro-organismes. Certaines parties sont identiques chez toutes les bactéries et sont donc utilisables comme sites d'hybridation pour des amorces universelles de séquences. La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté qui unissent des bactéries éloignées, tandis que les domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches. D'autres parties de séquences sont propres à un groupe d'individus et permettent ainsi l'identification de séquences dites signatures (ou motifs moléculaires) caractéristiques d'ordres taxonomiques différents (espèce, genre, famille ou classe) (Croce 2005).

Ces petites séquences signatures sont dites sondes phylogénétiques. Ce sont de petits oligonucléotides spécifiques de certains groupes d'organismes (voir tableau 9) :

² <http://rdp.cme.msu.edu/html>

Tableau 9 : Motifs des ARNr 16S et 18S pour les trois domaines du vivant (Madigan et Martinko, 2007).

Motifs nucléiques (signatures)	Position sur l'ARNr	Nombre d'occurrences chez :		
		<i>Archaea</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Eukarya</i>
CACYYG	315	0	> 95	0
AAACUCAA	910	3	100	0
AAACUAAAAG	910	100	0	100
YUYAAUUG	960	100	< 1	100
CAACCYYCR	1110	0	> 95	0
UCCUG	1380	> 90	0	100
UACACACCG	1400	0	> 99	100
CACACACCG	1400	100	0	0

Une autre raison qui a motivé le choix de cette molécule est la quantité de séquences présentes dans les bases publiques via Internet (GenBank de NCBI, EMBL et autres). Elle est telle qu'il est maintenant quasiment impossible d'utiliser une autre molécule et d'obtenir des résultats équivalents. De plus, c'est un gène ubiquitaire, bien conservé, soumis à des contraintes fortes et stables et relativement non affecté par les changements du milieu extérieur (Woese *et al.*, 1990).

Malgré son usage extrêmement répandu dans les études des bactéries et ses avantages, ce gène possède quelques limitations. La principale est son manque de pouvoir résolutif entre espèces proches (Achenbach *et al.*, 2001).

- Le facteur d'élongation α ou gène *tuf*

Le résultat d'une étude préalable sur la faisabilité du projet Aquachip a montré que l'ARNr 16S ne présente pas assez de variabilité par rapport à la diversité bactérienne pour assurer une identification précise de toutes les bactéries. Pour pallier à ce problème, il a été nécessaire de travailler sur un autre gène : le gène *tuf*. Ce gène code pour le facteur d'élongation alpha, impliqué dans la synthèse des protéines. Il facilite l'élongation des chaînes polypeptidiques lors de la traduction. Il est présent dans toutes les bactéries (Sela *et al.*, 1989). Ces caractéristiques font de lui un bon candidat pour les études phylogéniques (Ludwig *et al.*, 1994). Ce gène a été choisi aussi parce qu'il présente des domaines nucléotidiques ayant des vitesses d'évolution plus importantes que celles constatées dans l'ARNr 16S.

- Les facteurs de pathogénicité

L'utilisation d'un marqueur universel comme l'ARNr 16S ou *tuf* n'est cependant pas suffisante. La principale raison est qu'il existe des bactéries qui ne sont pathogènes que si un facteur de pathogénicité est présent dans leur génome ou dans un plasmide. Ces facteurs de pathogénicité doivent donc être utilisés comme marqueurs (portés par les bactéries pathogènes), en plus de l'ARNr 16S ou de *tuf*. Les gènes de pathogénicité sont spécifiques d'un groupe de bactéries et ont généralement un pouvoir résolutif plus important (Chang *et al.*, 2001). Ils permettent également de mettre en évidence une activité physiologique particulière, parfois différente entre des espèces proches phylogéniquement et permettent alors de résoudre des problèmes de diversité entre espèces proches (Bourne *et al.*, 2001).

Malheureusement ces gènes de pathogénicité ne sont pas exempts de défauts. En effet, La mise au point d'amorces universelles d'amplification se heurte à deux problèmes :

- la vitesse d'évolution de ces gènes est élevée ce qui réduit le nombre de domaines dans lesquels il existe des parties conservées.
- le manque de données de séquences ne permet pas de calculer des amorces efficaces pour toutes les variantes possibles.

Ces problèmes seront résolus en partie au fur et à mesure que de nouveaux gènes seront clonés et séquencés (Croce 2005).

3.4.2. Méthodes de construction des arbres phylogénétiques

Les différentes méthodes de constructions d'arbres phylogénétiques diffèrent à la fois par les hypothèses évolutives qu'elles impliquent et par les algorithmes qu'elles utilisent (Edwards et Cavalli- Sforz, 1964, Felsenste, 1973, Darlu et Tassy, 2004). Elles peuvent être regroupées en deux catégories :

1. Les méthodes de distances : Les distances génétiques (% de substitutions des nucléotides ou des acides aminés par exemple) sont mesurées entre toutes les séquences prises deux à deux. Ces méthodes sont rapides et donnent de bons résultats. On peut utiliser les programmes DNADIST ou PROTDIST du programme PHYLIP.
2. Les méthodes basées sur les caractères : S'intéressent aux caractères phénotypiques qui présentent des états supérieurs à deux. Elles regroupent les méthodes de "parcimonie" et les méthodes de "Maximum de vraisemblance".

Pour les méthodes de distances (qui intéresseront notre travail), il s'agit tout d'abord de choisir le critère de distance entre les futures feuilles de l'arbre (individus ou OTUs). Par exemple, si ces individus sont des séquences d'ADN, on peut choisir comme distance entre deux d'entre elles le nombre de nucléotides qui diffèrent. Pour déterminer cette valeur, on est amené à en effectuer un alignement multiple. Puis on peut utiliser la méthode UPGMA ou celle de NJ pour en déduire la topologie de l'arbre. Par contre, si ces individus ont été étudiés sur les plans morpho-physico-biochimiques, alors les distances découleront des coefficients de similarité (Luchetta *et al.*, 2005).

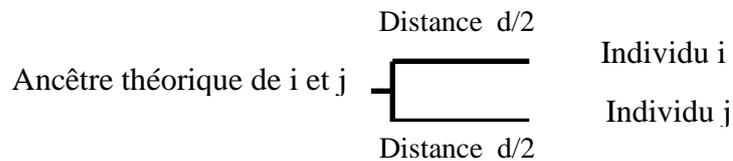
Les méthodes de distances utilisent deux algorithmes distincts pour construire des dendrogrammes :

3.4.2.1. La méthode UPGMA

UPGMA utilise un algorithme de clustérisation séquentiel dans lequel les relations sont identifiées dans l'ordre de leur similarité et la reconstruction de l'arbre se fait pas à pas grâce à cet ordre. Il y a d'abord identification des deux individus (OTUs) les plus proches et ce groupe est ensuite traité comme un seul individu, puis on recherche l'individu le plus proche et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il n'y ait plus que deux groupes. Cet algorithme permet de calculer un arbre ultra métrique (Luchetta *et al.*, 2005). La méthode UPGMA s'effectue selon les étapes suivantes :

-Etape 1: Dans la matrice des distances (symbolisées par d_{ij}), trouver les taxons i et j pour lesquels la distance d_{ij} est la plus petite. On clustérise tout d'abord les deux OTUs avec la distance la plus petite.

-Etape 2 : Mettre la racine (ancêtre théorique des deux OTUs choisis) à égale distance des deux OTU i et j c'est-à-dire à $d = d_{ij} / 2$. Cette distance sera égale à la longueur de la branche du clade qui regroupe les individus i et j :



-Etape 3 : Créer un nouvel ensemble incluant i et j.

-Etape 4 : Calculer la distance entre le nouveau groupe (ij) et chaque autre taxon (k), en appliquant la formule suivante : $(d_{ki} + d_{kj}) / 2$

-Etape 5 : A partir de cette nouvelle matrice, répéter l'opération depuis l'étape 1 (Lecoitre, 2001).

3.4.2.2. La méthode NJ

Cette méthode développée par Saitou et Nei (1987) tente de corriger la méthode UPGMA afin d'autoriser un taux de mutation différent sur les branches (arbre non ultra métrique). La matrice de distances permet de prendre en compte la divergence moyenne de chacun des individus avec les autres taxons

L'arbre est alors construit en reliant les individus les plus proches dans cette nouvelle matrice (Luchetta *et al.*, 2005). La méthode NJ s'effectue selon les étapes suivantes :

-Etape 1 : Calcul de la divergence nette $r(i)$ de chacun des N OTU par rapport aux autres

-Etape 2 : calcul de la nouvelle matrice des distances en utilisant la formule suivante :

$$M(i,j) = d(i,j) - [(r(i) + r(j)) / (N-2)]$$

-Etape 3 : choix des plus proches voisins, c'est-à-dire des deux OTUs ayant le $M(i,j)$ le plus petit. Les deux premiers OTUs forment un nouveau nœud u.

-Etape 4 : calcul de la distance de chacun des deux OTUs par rapport au nœud u.

$$S(i,u) = d(i,j)/2 + [r(i) - r(j)]/2(N-2)$$

$$\mathbf{D'o\grave{u}} \quad S(j,u) = d(i,j) - S(i,u)$$

-Etape 5 : Calcul des distances entre u et toutes les OTUs.

-Etape 6 : Créer une nouvelle matrice et répéter l'opération depuis l'étape 1 (Lecoitre, 2001).

3.4.3. Phylogénie de *Listeria* spp.

Dans le but d'améliorer la capacité d'analyse phylogénétique pour le genre *Listeria*, les informations génétiques sur les six espèces de *Listeria* ont été combinées dans données unies. Ces données incluent en plus de l'ADNr 23S et 16S les gènes *prs* et *ldh* (house-keeping genes) délimitant le cluster de virulence *vclB*, le gène *iap* localisé ailleurs sur le génome de *Listeria*.

Afin de combiner les informations phylogénétiques existantes dans les différents gènes, un arbre consensus a été calculé sur la base de l'union des données de séquences ADN-16S-ADNr-23S-*iap-ldh-vclB-prs*. Indépendamment de l'arbre, *L. grayi* a toujours la branche la plus longue. Les cinq espèces restantes sont regroupées dans deux groupes distincts. Un groupe représente *L. monocytogenes* et *L. innocua*, alors que l'autre contient *L. welshimeri*, *L. ivanovii* et *L. seeligeri*, avec *L. welshimeri* formant la branche la plus profonde dans ce groupe (Schmid *et al.*, 2005).

Une phylogénie à la base des séquences des ARNr 16S des souches de *Listeria* peut être construite sur la base d'un alignement multiple puis construction du dendrogramme selon l'algorithme NJ. Les séquences ARNr 16S relevées sur GenBank de NCBI présentent les différents codes d'accès suivants :

1	<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19118	JF967623.1
2	<i>L. innocua</i>	ATCC 33090	JF967625.1
3	<i>L. seeligeri</i>	ATCC 51335	JF967627.1
4	<i>L. welshimeri</i>	ATCC 43549	JF967629.1
5	<i>L. ivanovii</i>	ATCC BAA-678	JF967631.1
6	<i>L. grayi</i>	ATCC 25400	JF967632.1

La topologie du phylogramme est représentée dans la figure suivante :

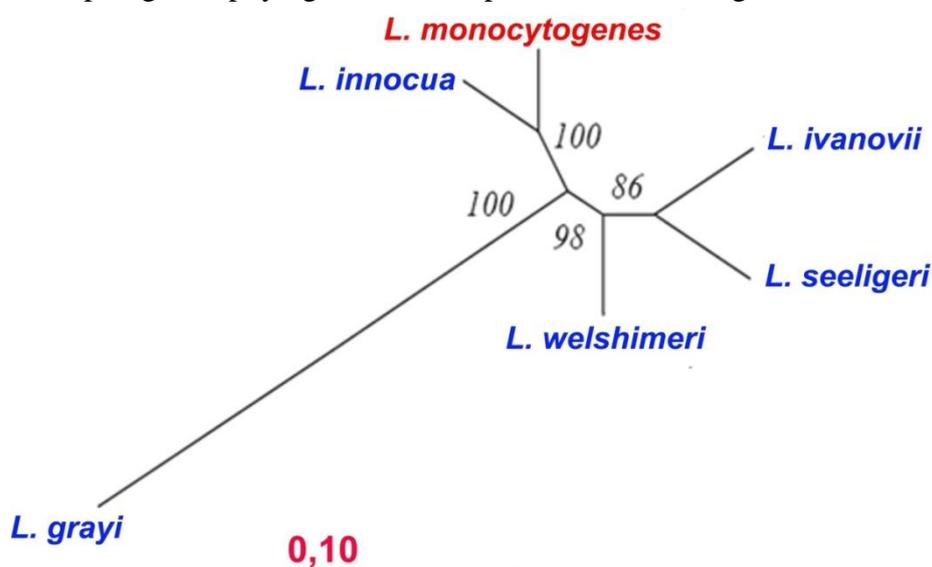


Figure 11: L'arbre de la composante phylogénétique de *Listeria* basé sur l'analyse comparative des séquences des ADNr 16S. La barre indique 10% de séquence divergente (Schmid *et al.*, 2005).

1. MATERIEL

1.1. Localisation géographique et description des échantillons

Les zones concernées par les prélèvements sont situées dans les deux Wilaya de Biskra (34°51'N/5°43'E ; au pied méridional du massif de l'Aurès) et de Mila (36°27'N/6°15'E) (voir tableau 10 et figures 12 et 13). Les échantillons de lait cru ont été prélevés à partir de six fermes (trois à Biskra et trois à Mila), délivrant le lait deux fois par jour (matin et après midi). Ces fermes combinées produisent approximativement 1350 L de lait cru par jour.

Tableau 10 : Localisation géographique des six fermes de production laitière.

Région	Localité	Altitude (m)	Latitude	Longitude
Biskra	Doucen	200	34°30'	5°3'
	El Hadjeb	139	34°47'	5°36'
	Sidi Okba	55	34°45'	5°54'
Mila	Grarem (Chef lieu)	293	36°51'	6°32'
	Ferdoua (Sidi Marouane)	289	36°31'	6°17'
	Siliana (Chigara)	328	36°32'	6°16'

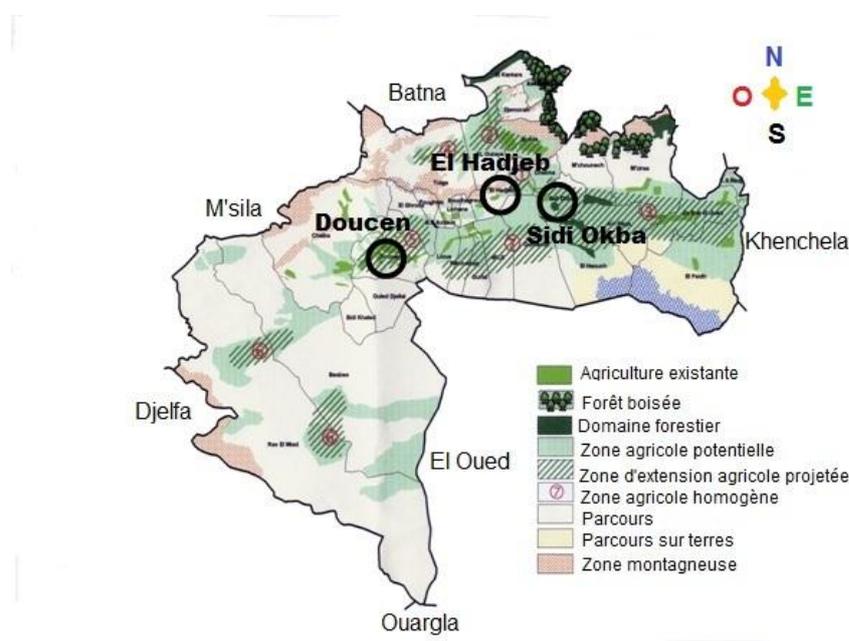


Figure 12 : Carte de la wilaya de Biskra (D.P.A.T., 2005).

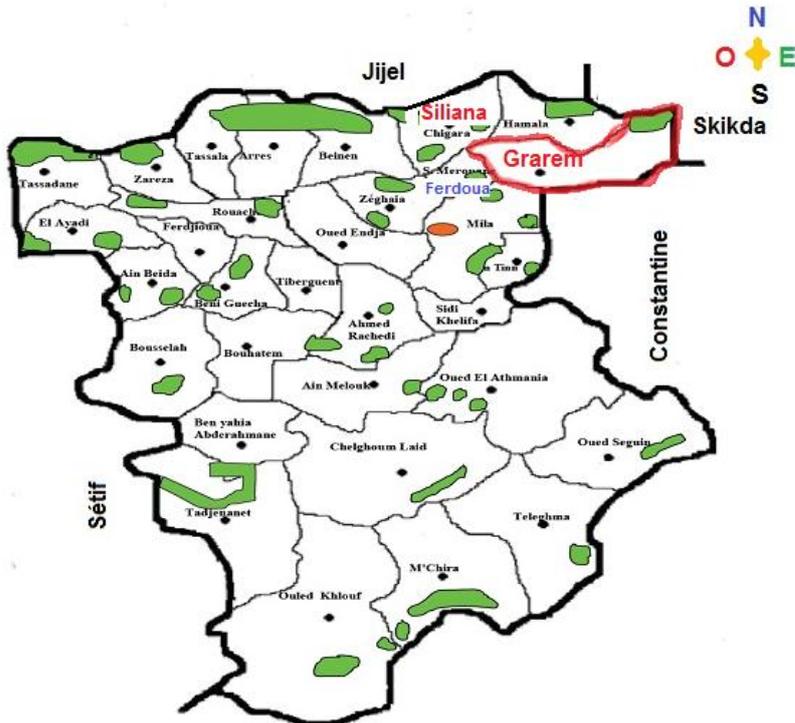


Figure 13 : Carte de la wilaya de Mila

Les prélèvements de lait cru ont été effectués durant la période d'Avril 2008 à Mars 2010. Ceci a permis d'avoir des échantillons de lait cru à différentes saisons.

Un total de 60 vaches laitières ont fait l'objet de prélèvement de lait :

- A. Biskra : 30 vaches réparties comme suit :
 - i. Sidi Okba : 12
 - ii. El Hadjeb : 10
 - iii. Doucen : 8
- B. Mila : 30 vaches réparties ainsi :
 - i. Grarem : 14
 - ii. Ferdoua (Sidi Marouane) : 10
 - iii. Siliana (Chigara) : 6

Les 60 vaches prélevées lors de ce travail sont principalement des hybrides et sont issues de croisements entre des bovins laitiers locaux et des vaches importées de l'étranger telles que la Française Frisonne Pie noire et la Montbéliard Pie rouge (voir Annexe A). Un total de 104 échantillons de lait cru ont été collectés à Biskra et à Mila (Tableau 11).

Tableau 11 : Prélèvements des laits crus par site et par mois

			Jan	Fév	Mars	Avr	Mai	Juin	Juil	Sept	Oct	Nov	Déc	Totaux	
2008	Biskra N=12	SO									5	4		9	
		EH				2	1							3	
		D												0	
	Mila N=16	G									4			4	8
		F										5			5
		S											3		3
2009	Biskra N=26	SO	5											5	
		EH			9								11		20
		D				5									5
	Mila N=24	G						6	6						12
		F	5												5
		S			3										3
2010	Biskra N=26	SO		13	10									23	
		EH												0	
		D	3											3	
	Mila N=0	G													0
		F													0
		S													0
Totaux			13	13	22	7	1	6	6	4	10	18	4	104	

Selon les constats des Docteurs vétérinaires (Biskra et Mila) présents au moment de tous les prélèvements, les vaches laitières ayant fait l'objet de cette étude ne présentaient aucun signe apparent de maladies. Elle n'était pas sous traitement antibiotique, n'étaient pas gestantes et avaient une moyenne d'âge de trois ans.

Dans toutes les fermes visitées, l'alimentation de l'animal était faite essentiellement d'ensilage qui est renforcé par les suppléments alimentaires. Le revêtement en ciment du sol et des murs est souvent absent, et les vaches sont exposées directement à la terre où se mélangent ensilage et matières fécales. La traite se fait de manière mécanique à l'aide de machines trayeuse pour faciliter et accélérer le processus.

A chaque prélèvement, les premiers jets sont éliminés et 25 mL (**JORADP**) de lait cru sont collectés directement des quatre pis de chaque vache et transférés dans des flacons stériles. Immédiatement, les données de température et d'humidité relatives sont enregistrées et les échantillons sont transportés au laboratoire à +4°C dans une glacière. Le nombre d'échantillons prélevés n'étant pas constant à chaque prélèvement, du fait que les vaches malades et gestantes n'ont pas été prélevées.

Les données climatiques (Température et humidité) sont obtenues auprès des stations météorologiques de l'aéroport Mohammed Khider à Biskra, et celle de l'aéroport de Mohamed Boudiaf à Constantine pour la région de Mila.

1.2. Milieux pour l'isolement et la purification des bactéries

Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification bactérienne sont spécifiques aux germes à identifier.

En effet, les milieux de culture employés sont :

1. Gélose nutritive additionnée de 5 % de sang cuit de cheval : pour le réensemencement et la purification des souches *Listeria spp.* et autres germes tels que les entérocoques. Le sang est additionné lorsque le milieu gélosé est en surfusion. Les flacons sont ensuite portés au bain-marie à 75-80°C pendant 10 minutes. Nous faisons la remarque à ce stade que la gélose chocolat aurait pu être utilisée ; sauf que nous ne disposons pas d'hémoglobine pure pour l'incorporer en milieu Mueller-Hinton. Gélose nutritive additionnée de 5 % de sang frais de cheval : pour tester la β -hémolyse des souches *Listeria spp.* L'addition de sang de cheval s'est faite aux voisinages de 45-50°C.
2. Gélose nutritive au sang cuit additionnée de céfazoline à la concentration de 20 mg/L : pour favoriser l'isolement des souches *Listeria spp.* Notons à ce stade que cette gélose a remplacé le milieu sélectif pour l'isolement de *L. monocytogenes*, à savoir le milieu Palcam (non disponible à l'Institut Pasteur d'Algérie au moment de la réalisation de ce travail). La céfazoline est un antibiotique appartenant à la famille des céphalosporines de la première génération, pour lequel *Listeria spp.* et d'autres bactéries sont résistantes.
3. Une série de milieux dits standards a été utilisée pour la caractérisation biochimique et physiologique des *Listeria* et des autres germes isolés : Milieu TSI, Citrate de Simmons, Bouillon nitraté, Gélose à l'esculine, Milieu urée-Indole, eau oxygénée à 10 volumes (catalase), Milieu Clark et Lubs, Mannitol-Mobilité.
4. L'antibiogramme a été réalisé avec la collection d'antibiotiques suivants : antibiogramme : Acide Fusidique, Tétracycline, Vancomycine, Gentamycine, Colistine, Erythromycine, Pénicilline et Cefazoline

1.3. Biologie moléculaire : Les principales étapes ont nécessité des produits spécifiques :

A- Extraction de l'ADN génomique : L'eau bi-distillée a servi aux chocs thermiques.

B- Amplification de l'ADNr 16S par PCR : Solution mixte contenant les réactifs mentionnés sur le tableau suivant :

Tableau 12 : Composition de la solution mixte pour la PCR.

Produits	Volumes (1 tube)	Volumes (6 tubes)
H ₂ O bi-distillée stérile	4,6 µl	27,6 µl
Tampon taq x 5 fois	4 µl	24 µl
dNTP (1mM)	4 µl	24 µl
Mg Cl ₂ (25mM)	1,2 µl	7,2 µl
fD1 (10µM)	2 µl	12 µl
Rs16 (10µM)	2 µl	12 µl
Taq polymérase (5U /µl)	0,2 µl	1,2 µl
ADN génomique	2 µl	12 µl
Volume final	20µl /tube	120µl / 6 tubes

Les amorces (également appelées primers) utilisées pour l'amplification répondent au standard c'est-à-dire une taille comprise entre 18 et 26 paires de bases, un % GC ne dépassant pas les 60 % et elles contiennent (au moins l'une d'elles) 3 A ou T dans les cinq derniers nucléotides :

Amorce sens ou forward : fD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	20 nucléotides %GC = 50
Amorce antisens ou reverse : Rs16	5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'	22 nucléotides %GC = 45,5

C- Electrophorèse des fragments d'ADN : Gel d'agarose à 1%, solution de charge (1ml contient : 2,5 mg de bleu de bromophénol, 300 µl de glycérol, qsp 700 µl d'eau distillée stérile)

D- Réaction de Séquençage : Les produits de la PCR, didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) marqués par des fluorochromes, gel de polyacrylamide

E- Purification des produits de séquençage : solution Magnesil Green, éthanol à 90%, Formamide, solution Magnesil Yellow, Magnesil Green , solution de water free nuclease.

F- Analyse bioinformatique des séquences : le matériel utilisé est un outil informatique libre de droits disponible sur plusieurs portails et sites Internet, en particulier sur NCBI. Celui-ci offre la possibilité de comparer (aligner) une séquence inconnue contre des séquences connues se trouvant sur la base de données de NCBI. Cette base de données est appelée GenBank, la plus consultée mondialement. L'outil principal qui permet la comparaison de la séquence inconnue avec les séquences de GenBank est appelé BLAST³. Il permet de calculer

³ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

des scores d'identité (égalité des nucléotides entre séquences prises deux à deux et position par position). Plus ce score (exprimé en %) est élevé est plus la similarité entre les deux séquences est importante.

2. METHODES

2.1. Analyses bactériologiques

L'isolement et l'identification phénotypiques présomptifs ont été effectués au:

- Laboratoire du Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Khider, Biskra, Algérie.
- Laboratoire d'Hygiène, Direction des Services de la Santé, Mila, Algérie.

L'identification génotypique (PCR et Séquençage d'ADNr 16S) a été réalisée au:

- Laboratoire de Biotechnologie Microbienne de l'Université Sidi Mohamed Ben Abdullah (U.S.M.B.A), Fès, Maroc, pour le cas de la PCR.
- Centre Universitaire Régional d'Interface (C.U.R.I), Fès, Maroc, pour séquencer les ADN amplifiés par PCR.

Les étapes pour l'isolement et l'identification des *Listeria spp.* sont résumées dans la Figure 14. L'étape initiale d'enrichissement et de concentration des pathogènes est indispensable et n'est valable que pour les échantillons liquides (cas du lait cru). Pour cela, nous avons conservé à une température basse et sélective (4°C) les échantillons de lait pour favoriser *Listeria monocytogenes* et en augmenter la population (fréquence relative) sans pour autant gêner le reste des germes car la recherche que nous effectuons est purement qualitative. La flore totale aérobie mésophile est immédiatement recherchée sur gélose nutritive avant conservation des échantillons à froid.

A des intervalles de temps réguliers (chaque semaine, pendant trois semaines), un des échantillons conservés à froid est ensemencé sur gélose au sang cuit avec et sans Cefazoline (Sandoz GmbH, Kundl-Autriche) pour apprécier l'éventuelle présence de *L. monocytogenes*.

2.1.1. Culture et isolement

Des volumes de 0,1 mL de lait cru (solution mère) et aux dilutions 1/2 et 1/4 ont été étalés en surface sur les milieux de cultures :

- la gélose nutritive sans addition d'antibiotique pour la recherche des germes totaux avant conservation des échantillons à froid (4 °C),
- la gélose nutritive au sang de cheval cuit additionnée de Cefazoline,

Les cultures ont été incubées pendant 48 h à 37°C.

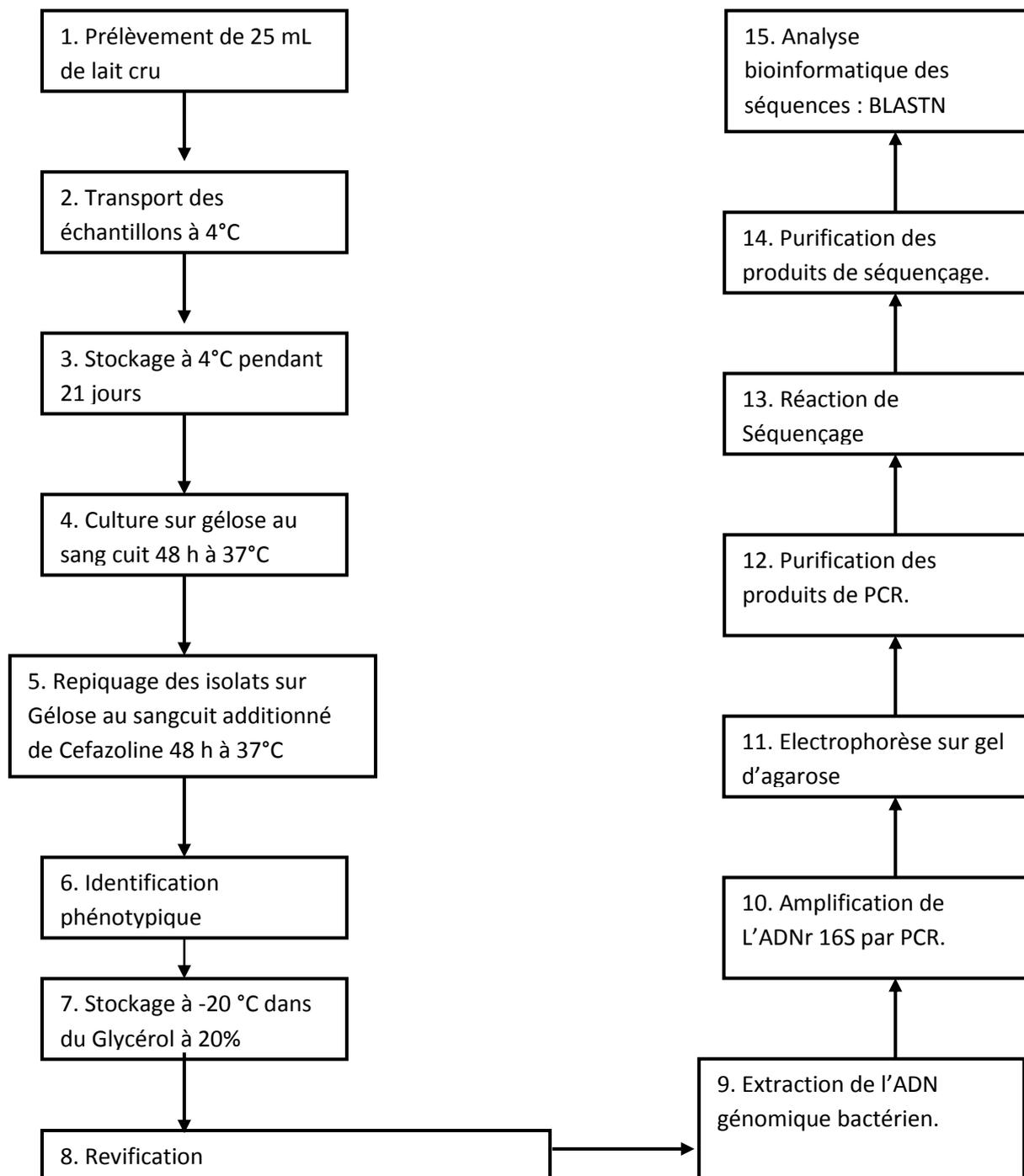


Figure 14 : Les étapes pour l'isolement et de l'identification des *Listeria spp.*

Tous les isolats ont été repiqués pour purification sur une gélose au sang cuit non additionnée de Cefazoline puis incubés pendant 48h à 37 °C. Après incubation, une série de tests d'identification phénotypiques et génotypiques ont été réalisés.

2.1.2. Identification phénotypique des souches

L'identification phénotypique des isolats a été réalisée en utilisant les critères morphologiques, culturels et physio-biochimiques (voir Annexe B). Les tests et examens d'identification phénotypique ayant été réalisés sont :

1. Examen de l'aspect macroscopique des colonies
2. coloration de Gram
3. mobilité à 25 et à 37°C
4. présence de catalase
5. présence d'oxydase
6. rouge de méthyle (test RM)
7. réaction de Voges-Proskauer (test VP)
8. production d'indole
9. hydrolyse de l'esculine
10. présence d'uréase
11. réduction des nitrates
12. production d'H₂S (test sur milieu TSI)
13. activité β-hémolytique
14. antibiogramme : Acide Fusidique, Tétracycline, Vancomycine, Gentamycine, Colistine, Erythromycine, Pénicilline et Cefazoline

2.1.3. Identification génotypique des souches

Les principales étapes de l'identification génotypique que nous avons réalisées sur les différents isolats sont :

- A-** Extraction de l'ADN génomique à partir des isolats bactériens.
- B-** Amplification de L'ADNr 16S par PCR.
- C-** Electrophorèse sur gel d'agarose.
- D-** Purification des produits de PCR.
- E-** Réaction de Séquençage des ADNr 16 S des différentes souches.
- F-** Purification des produits de séquençage.
- G-** Analyse bioinformatique des séquences ADNr 16 S ; confrontation avec l'outil Blast.

A. Extraction de l'ADN

La méthode utilisée pour l'extraction de l'ADN génomique est le choc thermique. Il a été effectué comme suit :

- Mettre 50 µl d'eau bi-distillée stérile dans le tube à Eppendorf.
- Suspender l'inoculum dans l'eau par une anse.
- Congeler à -20 °C pour une durée de 30 minutes.
- Décongeler pendant 5 minutes à 94°C dans un bain-marie.

- Répéter une deuxième fois la congélation /décongélation.
- Centrifuger à 7000 rpm pendant 10 minutes.
- Prélever 2 µl du surnageant contenant de l'ADN pour réaliser la réaction d'amplification par la technique de la PCR.

Remarques et précautions prises en compte:

- La réalisation du processus du choc thermique à deux reprises permet d'améliorer l'extraction de l'ADN des bactéries.
- Si les colonies sont grandes prélever à partir d'une seule colonie.
- Si les colonies sont petites prélever plusieurs.
- Eviter de toucher les bords des tubes à Eppendorf lors du dépôt d'eau et d'inoculum.

B. Amplification de L'ADNr 16S par PCR

-Principe

C'est une méthode simple à réaliser ne nécessitant que quelques variations thermiques cycliques réalisées sur un même échantillon. L'emploi d'une ADN polymérase thermorésistante, la Taq Polymérase (issue de *Thermophilus aquavarum*) évite d'ajouter l'enzyme à chaque cycle. Elle se base principalement sur trois étapes : **dénaturation, hybridation et polymérisation.**

Connaissant la structure primaire de la séquence cible (ou de ses extrémités éventuelles), celle-ci peut être amplifiée *in vitro* par une extension convergente simultanée en utilisant des amorces spécifiques encadrant la cible à amplifier.

Les deux amorces sont additionnées à l'ADN (dans notre cas l'ADN 16S) génomique dans des conditions d'hybridation avec la cible après sa dénaturation (séparation des deux brins sous l'effet de la température). Les deux amorces se placent en face de leurs séquences complémentaires situées sur les deux extrémités 3' des deux brins à amplifier. Leur élongation dans le sens 5' → 3' par l'ADN polymérase permet à chaque brin de la cible d'être recopié uniquement sur la zone encadrée par les deux amorces.

L'opération est reprise en plusieurs cycles. Chacun de ces cycles comprendra :

- un temps de dénaturation de l'ADN cible à amplifier,
- un temps pour l'hybridation des amorces avec les extrémités 3' de l'ADN cible (généralement > 40 °C),
- un temps nécessaire à l'extension des deux amorces

-Préparation de la solution mixte

Pour diminuer les risques d'erreurs et de contamination nous avons préparé une solution mixte contenant tous les composants de la PCR.

Remarques :

- Les composants de la PCR (tampon Taq, dNTP, Mg Cl₂, Primers, Taq polymerase) ainsi que l'ADN génomique à amplifier sont gardés séparés dans leurs tubes respectifs dans de la glace jusqu'à la fin de la manipulation.
- A chaque fois qu'un composant de la PCR est ajouté au volume réactionnel, nous effectuons un rinçage (l'eau est le premier composant ajouté).

- Il faut à chaque fois changer d'embout.
- L'enzyme Taq polymérase est le dernier composant ajouté à la solution mixte avant la mise en contact avec l'ADN génomique à amplifier (car il constitue le substrat enzymatique).

-Amplification

Après avoir placé les tubes contenant l'ADN bactérien dans le Thermocycleur (TECHNE, Techgene), une prédénaturation à 94°C pendant 5 minutes est entamée. Ensuite, le programme d'amplification est exécuté selon trois étapes répétées en 35 cycles :

- Dénaturation à 94 °C pendant 1 min.
- Hybridation des amorces à 50 °C pendant 1 min.
- Elongation (polymérisation) à 72 °C pendant 1 min.

Enfin, une étape d'élongation finale est réalisée à 72°C pour 5 minutes. La taille de l'amplimère obtenu était de 700 pb pour tous les échantillons amplifiés comparativement aux marqueurs de taille utilisés.

C. Electrophorèse sur gel d'agarose

Une Electrophorèse, sur gel d'agarose à 1%, des produits de PCR a été réalisée pour confirmer la réussite de l'amplification.

Préparation du gel

- Peser 0,5 g d'agarose dans un Erlenmeyer de capacité suffisante.
- Ajouter l'agarose à 50 ml de TAE.
- Chauffer avec agitation jusqu'à ébullition et disparition du trouble.
- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (température environ 45-50 °C).
- Ajouter 4 à 5 % de BET (2µl de BET dans 50ml TAE).
- Agiter (sans chauffer) doucement pour éviter la formation de bulles d'air.
- Préparer le moule pour le coulage du gel.
- Placer le moule sur une surface bien horizontale.
- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur et laisser gélifier dans la cuve, le peigne mis au préalable crée des espaces pour les puits.
- Laisser refroidir 30 minutes environ avant d'enlever délicatement le peigne.
- Les puits sont placés du côté de la cathode.

Le gel est enfin prêt pour le dépôt des échantillons.

Dépôt des échantillons (produits d'amplification)

- Mélanger la solution de charge (bleu de bromophénol et glycérol) avec l'ADN sur un morceau de parafilm (2 µl d'ADN et 2 µl de la solution de charge) avec une micropipette.
- Pipeter 2 µl de ce mélange en fixant fermement la pipette avec l'autre main.
- Mélanger sur support de parafilm un volume de la solution de charge (contenant l'ADN

amplifié par PCR) avec un volume donné de la solution mixte.

- Remplir les puits avec ce mélange en faisant attention à ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette.

Migration

-Fermer la cuve, brancher les fils et exercez un voltage de 70 v jusqu'à 80 v pendant 5 minutes pour permettre la sortie de l'ADN des puits.

-Ensuite, descendre à 50 v le reste de l'électrophorèse.

-Laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 30 minutes).

-Quand le témoin de migration (colorant bleu) atteint l'extrémité du gel, le courant est coupé.

Visualisation

La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un colorant fluorescent le bromure d'Ethidium (BET). Ce composé possède la propriété de s'intercaler entre les paires de bases des acides nucléiques. Le gel est visualisé dans l'obscurité à l'aide d'un Transilluminateur à UV puis photographié avec un appareil numérique ou scanner.

Remarques :

- Pour observer les fragments d'acide nucléiques, utiliser les UV à $\lambda = 254\text{nm}$.

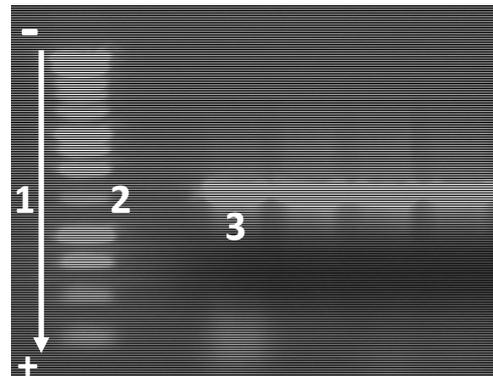
- Le gel doit être manipulé avec soin car il est très fragile.

ADN de quatre bactéries visualisé au Transilluminateur à UV en présence de marqueur de taille après électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Photo réalisée au Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Fes, Maroc, 2009).

1 : Sens de la migration

2 : Marqueur de taille (750 pb)

3 : ADNr 16S amplifié.



D. Purification des produits de PCR

Elimination du Triton-X

Le Triton-X est un détergent ionique puissant qui entre dans la composition du tampon de la réaction PCR. Sa présence dans le produit d'amplification gêne le séquençage. Pour cette raison il doit être éliminé :

- Les produit d'amplification de chaque souche sont rassemblés (50 μl) dans un tube Eppendorf (de volume égale à 1,5 ml). Ensuite, le volume est complété à 360 μl par de l'eau bi-distillée stérile puis à 400 μl par NaCl 3M.

- Après ajout de 800 μl d'éthanol absolu, une congélation à -20°C pendant 30 minutes est entamée. Elle est suivie d'une centrifugation à 4°C durant 20 minutes à 10 000 rpm.

- Le surnageant est éliminé, le culot est lavé dans un volume de 1ml d'éthanol à 70% puis re-centrifugé à la même vitesse pendant 5 minutes. Ce lavage est effectué deux fois.

- Le surnageant est éliminé et le culot contenant l'ADN est séché, ensuite re-suspendu dans un

volume de 20 µl de TE (pH=8) (Tris : 10mM ; EDTA : 1 mM) et conservé à 4°C.

Elimination des amorces

Dans chaque tube contenant le produit PCR conservé contenant l'ADN amplifié et les amorces, dans du TE :

-Ajouter 100 µl de la solution Magnesil Yellow (de la société Génome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.

-Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 45 secondes puis re-mélanger.

-Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.

-Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 200 µl d'éthanol à 80%.

-Mélanger à l'aide une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.

-Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant contenant les amorces.

-Récupérer les tubes du portoir magnétique puis ajouter 100 µl d'éthanol à 80% et procéder comme auparavant. Cette étape de lavage est répétée deux fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.

-Ajouter 100 µl d'une solution de water free nuclease (pour dégager l'ADN des billes).

-Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 60 secondes puis re-mélanger.

-Transférer les tubes dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes contre la paroi du tube, puis récupérer le surnageant contenant l'ADN libre amplifié dans de nouveaux tubes.

-Transférer les tubes de nouveau dans le portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes restantes puis récupérer le surnageant dans de nouveaux tubes. Ces derniers sont conservés à 4°C.

E. Réaction de séquençage

Le séquençage est accompli sur les produits de PCR préalablement purifiés. Il est réalisé selon la technique automatisée de Sanger. Cette méthode consiste à faire une amplification spécifique (PCR, tableau 13) dans laquelle ont été utilisés des didésoxynucléosides triphosphates (ddNTP) généralement marqués par des fluorochromes. L'incorporation du ddNTP par l'ADN polymérase bloque l'allongement de la molécule d'ADN en cours de copie. Nous obtenons donc une famille de fragments d'ADN synthétisés avec des longueurs différentes.

Ces fragments nucléiques sont séparés par électrophorèse selon leur longueur. Les plus petits migrent plus rapidement. Le pouvoir discriminant du gel de polyacrylamide est tel qu'il permet de différencier des brins de l'ADN ne différant en longueur que par un seul nucléotide.

La séquence de l'ADN amplifié est alors lue par un balayage automatique qui permet de

distinguer grâce à des fluorochromes différentes les quatre bases A, T, C ou G.

L'utilisation de logiciels informatiques permet de fournir un tracé électrophorétique avec des couleurs différentes pour chaque base élémentaire (voir Annexes C1 et C2).

PCR de séquençage : A ce stade sont ajoutées les bases sous formes de ddNTPs qui servent à inhiber l'ADN polymérase.

Tableau 13 : Mélange réactionnel pour la PCR de séquençage.

Réactifs	Volume (µl)
Big Dye (Tampon Taq, MgCl ₂ , Taq polymérase, dNTPs, ddNTPs)	2
fD1 (10 µM) ou Rs 16 (10 µM)	2
H ₂ O pure	6
Produit PCR	10
Volume final	20

Amplification

Après une prédénaturation à 96°C pendant 5 minutes, 25 cycles successifs ont été entrepris ; chacun comprenant :

- Dénaturation à 96°C pendant 10 secondes.
- Hybridation à 55°C pendant 10 secondes.
- Elongation à 60°C pendant 4 minutes.

F. Purification des produits de séquençage

Afin d'éliminer tout le matériel nucléique (amorces, ddNTP, dNTP) qui peut gêner la lecture de la séquence, une purification est réalisée selon le protocole suivant :

- Dans un tube Eppendorf de 0,5 ml, déposer 10 µl de produit de séquence.
- Ajouter 90 µl de la solution Magnesil Green (de la société Génome biotechnologie) contenant des billes fixant l'ADN.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique et ajouter 100 µl d'éthanol à 90%.
- Mélanger à l'aide d'une micropipette, laisser agir durant 5 minutes puis re-mélanger.
- Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis jeter le surnageant.
- Récupérer les tubes du portoir magnétique puis répéter l'étape de lavage avec l'éthanol à 90% une deuxième fois. Ensuite, les tubes sont séchés 5 à 10 minutes à température ambiante.

-Re-suspendre les particules dans 20 µl de formamide. Laisser agir 1 à 2 minutes puis remélanger.

-Transférer les tubes dans un portoir magnétique et mélanger jusqu'à l'adhésion totale des billes puis récupérer le surnageant contenant le formamide et les produits de séquence dans de nouveaux tubes. Le séquençage peut ainsi être effectué.

La plaque contenant les échantillons est placée dans le séquenceur. Les 16 capillaires auxquels est associée une électrode, vont être plongés dans les échantillons.

G. Analyse bioinformatique des séquences

L'analyse bioinformatique des séquences ADN 16S a été réalisée sur le site miroir du NCBI qui offre la possibilité d'aligner nos séquences ADN 16S avec celles de la banque nucléaire (GenBank en l'occurrence). Ce sont les séquences des souches ayant poussé sur gélose additionnée de Céfazoline.

BLAST, un outil d'alignement local du NCBI, est un programme en ligne libre de droits permettant de rechercher des séquences similaires dans une banque de séquences à partir d'une séquence requête (query) d'ADN. Le programme BLAST contient six programmes différents d'alignement des séquences (appelés parfums de BLAST). BLASTN (N pour nucleotide) est l'un des différents parfums de Blast et est utilisé pour comparer une séquence requête nucléaire à une banque de séquences nucléiques.

L'utilisation des différents types de parfums de Blast dépend de la nature de la séquence requête ; en effet :

- Blastn : compare une séquence requête nucléaire contre une base de séquences nucléiques,
- Blastp : compare une séquence requête protéique contre une base de séquences protéiques (SwissProt par exemple),
- Blastx : compare une séquence requête nucléaire traduite selon six phases de lectures (ORF : Open Reading Frame : cadres de lecture ouverts) contre une banque de séquences protéiques,
- Tblastn : Compare une séquence requête protéique contre une banque de séquences nucléiques traduites selon les six phases de lecture,
- Tblastx : compare une séquence requête nucléaire traduite en six phases de lecture contre une banques de séquences nucléiques traduites en six phases de lecture.

Après alignement de chacune de nos séquences ADNr 16S avec l'outil BLASTN, seules les séquences de GenBank ayant une similarité (avec notre séquence) supérieure ou égale 99% et une E-value nulle ont été retenues car la définition moléculaire du genre stipule que les homologies des séquences des ADNr 16S doivent être supérieures ou égale à 97%. Une homologie supérieure ou égale à 99% traduit l'appartenance à une même espèce. Alors qu'un score d'homologie inférieur à 97% ne permet pas l'identification.

Dans le cas où plusieurs séquences sont proposées par la banque, et qui ont la même E-value et le même pourcentage d'identité, nous avons tranché pour la séquence ayant présenté le meilleur score d'alignement avec notre séquence requête.

2.2. Analyses statistiques

Afin de mettre en évidence les éventuelles associations entre les différents germes d'une part, et les facteurs spatio-temporels (saisons et origine géographique des prélèvements), d'une autre part, nous avons procédé à des analyses factorielles suivies d'une classification ascendante hiérarchique (dendrogrammes des facteurs spatio-temporels) réalisée par la méthode UPGMA. L'analyse factorielle faisant partie d'un ensemble de méthodes statistiques appelées *méthodes d'analyse de données*.

En effet, l'étude de l'écosystème lait, à travers son microbiote, en fonction des dimensions espace (zone géographique de prélèvement) et temps (saisons de prélèvements) est un système multivarié de la forme : Bactéries x Saisons x Sites

C'est donc un système pluridimensionnel qui impose, pour son étude, des analyses factorielles spécifiques intégrant des facteurs chronologiques ou spatiaux dont l'usage en écologie bactérienne reste encore peu répandu.

Les variables retenues pour ces analyses factorielles sont les 13 germes isolés dans la totalité des échantillons, à savoir :

1. *Enterococcus*
2. *Listeria*
3. *Staphylococcus*
4. *Acinetobacter*
5. *Proteus*
6. *Aeromonas*
7. *Pseudomonas*
8. *Klebsiella*
9. *Yersinia*
10. *Bacillus*
11. *Flavobacterium*
12. *Alcaligenes*
13. *Stenotrophomonas*

Les facteurs spatio-temporels sont :

Facteur saisons : Hiver, Printemps, Eté et Automne

Facteur sites : Biskra et Mila (chacune avec ses trois localités)

Ses facteurs, réunis, forment une série statistique chronologique du fait qu'ils ont été étudiés en différentes années consécutives : 2008, 2009 et 2010.

Ces associations de facteurs ont donné pour le facteur "Saisons" :

Hiver 2008, 2009, 2010 : H8, H9 et H10

Printemps 2008, 2009, 2010 : P8, P9 et P10

Eté 2008, 2009, 2010 : E8, E9 et E10 (seul l'E9 a été retenu)

Automne 2008, 2009, 2010 : A8, A9 et A10 (seuls A8 et A9 ont été retenus)

Soit un total de neuf (09) facteurs.

Pour le facteur "Sites", les deux Sites sont subdivisés en fonctions des localités où ont eu lieu

les différents prélèvements :

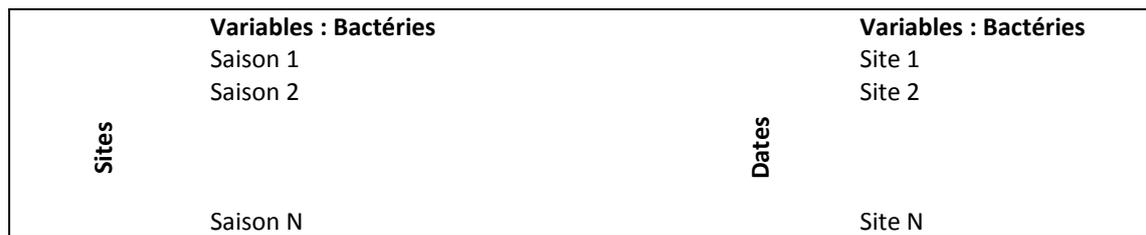
Biskra : Doucene, El-Hadjeb et Sidi Okba

Mila : Grarem, Ferdoua (Sidi Marouane) et Siliana (Chigara)

Soit un total de six (06) facteurs.

A la fin, nous obtenons une matrice dont les lignes sont les variables représentées par les 13 germes et dont les colonnes sont les différentes subdivisions des deux facteurs ; neuf (facteur saison) et six (facteur sites) pour un total de 15 facteurs.

Le schéma suivant montre l'organisation des données tridimensionnelles récoltées dans le cadre de notre étude spatio-temporelle :



Nous avons procédé à deux analyses factorielles différentes à savoir :

L'ACP : Analyse de données permettant de mettre en évidence les différentes associations entre les deux meilleurs facteurs parmi les 15 retenus en fonction de la nature des 13 germes isolés. L'ACP propose de représenter le nuage de points formé par l'ensemble des individus selon deux dimensions ou composantes principales (deux bactéries) au lieu de le représenter dans les n dimensions (n = 13 bactéries) ; ce qui n'est pas possible à l'œil humain. Or nous ne pouvons concevoir de telles dimensions ; faute de quoi une représentation en deux dimensions serait la bien venue.

L'AFM : C'est une méthode exploratoire et descriptive permettant d'analyser des tableaux à double entrée (tableaux de contingence). Cette analyse va permettre de faire ressortir les éventuelles associations entre les différents germes et les dimensions spatio-temporelles.

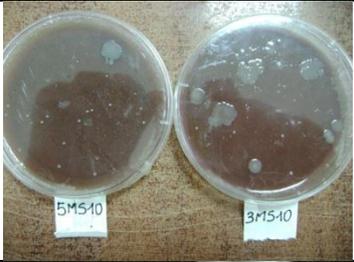
Le logiciel Xlstat package 2012 a été utilisé pour réaliser ces analyses factorielles après fusion avec le support fondamental de MS-Excel 2007.

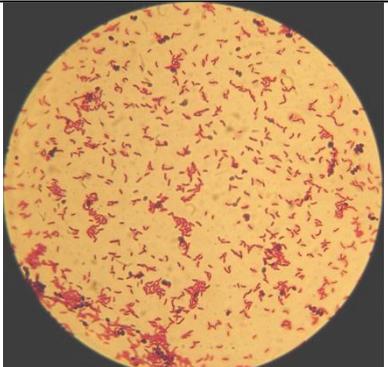
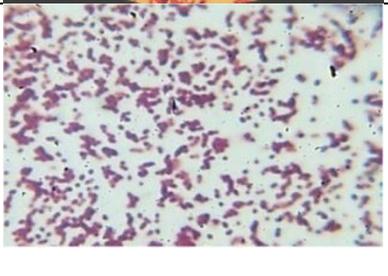
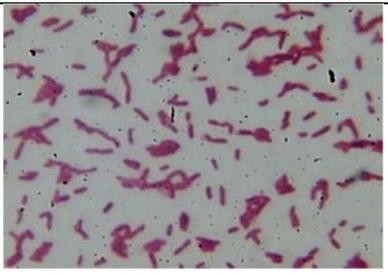
3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. Incidence totale : Sur le total des 104 échantillons de laits crus analysés, seuls 70 échantillons ont présenté une culture bactérienne positive sur gélose au sang additionnée de Cefazoline ; soit 67,31 %.

L'ensemble des propriétés morphologiques des bactéries isolées à partir de ces échantillons positifs, ayant poussé sur gélose au sang additionnée de Cefazoline, est résumé dans le tableau 14 avec une description morphologique macroscopique ou microscopique selon les cas :

Tableau 14 : Bactéries isolées sur gélose au sang additionnée de Cefazoline

<i>Proteus spp</i>		Aspect macroscopique des colonies de <i>Proteus spp.</i> sur gélose au sang. Les colonies sont grises, grandes (1 à 3 cm), plates, à croissance radiale et à contour irrégulier (Photo réalisée au Laboratoire d'Hygiène de Mila).
<i>Acinetobacter spp</i>		Aspect macroscopique des colonies d' <i>Acinetobacter spp.</i> sur gélose au sang. Les colonies sont blanches, grandes (4 à 5 mm), rondes à contour régulier, bombées et luisantes (Photo réalisée au Laboratoire d'Hygiène de Mila)
<i>Enterococcus spp</i>		Aspect macroscopique des colonies d' <i>Enterococcus spp.</i> sur gélose nutritive. Les colonies sont de très petites tailles (environ 1 mm), opaques, rondes à contour régulier (Photo réalisée au Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Fes, Maroc)
<i>Listeria spp</i>		Morphologie de <i>Listeria spp.</i> observée au grossissement 1000 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des bacilles courts à Gram positif aux extrémités arrondies, isolées et beaucoup plus associées en diplobacilles (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra).
<i>Aeromonas spp</i>		Aspect macroscopique des colonies d' <i>Aeromonas spp.</i> sur gélose au sang. Les colonies sont jaune marron, crémeuses, rondes à contour arrondi, légèrement bombées, environ 3 mm de diamètre. Les souches isolées ont été souvent à pouvoir hémolytique (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra)

<i>Aeromonas spp</i>		Morphologie de <i>Aeromonas spp.</i> , observée par coloration de Gram au grossissement 1000 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des bacilles fins à Gram négatif légèrement incurvés (Photo réalisée au Laboratoire d'Hygiène de Mila).
<i>Staphylococcus spp.</i>		Morphologie de <i>Staphylococcus spp.</i> , observée par coloration de Gram au grossissement 1000 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des coques à Gram positif regroupées en amas (Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Biskra).
<i>Bacillus spp.</i>		L'observation macroscopique de <i>Bacillus spp.</i> révèle des colonies de grandes tailles, à reliefs luisants. L'observation microscopique par coloration de Gram, au grossissement 1000 à l'huile d'immersion fait apparaître des bâtonnets à Gram positif et à extrémités rectangulaires.
<i>Yersinia spp.</i>		L'observation macroscopique de <i>Yersinia spp.</i> montre des colonies de petite taille (environ 1 mm de diamètre). L'observation microscopique par coloration de Gram, au grossissement 1000 à l'huile d'immersion fait apparaître des coccobacilles à Gram négatif, isolés ou en paires.
<i>Alcaligenes spp.</i>		L'observation microscopique de <i>Alcaligenes spp.</i> par coloration de Gram, au grossissement 1000 à l'huile d'immersion fait apparaître des coccobacilles à Gram négatif
<i>Pseudomonas spp.</i>		L'observation macroscopique de <i>Pseudomonas spp.</i> montre des colonies plates, pigmentées allant du jaune à l'orange. L'observation microscopique par coloration de Gram, au grossissement 1000 à l'huile d'immersion fait apparaître des bacilles longs et fins à Gram négatif.
<i>Flavobacterium spp.</i>		L'observation macroscopique de <i>Flavobacterium spp.</i> fait apparaître des colonies jaunes. L'observation microscopique par coloration de Gram, au grossissement 1000 à l'huile d'immersion fait apparaître des bacilles longs et fins à Gram négatif.
<i>Stenotrophomonas spp.</i>		Aspect macroscopique des colonies de <i>Stenotrophomonas spp.</i> sur gélose nutritive. Les colonies sont jaunes oranges, grandes (3 à 4 mm), rondes à contour régulier, plates, visqueuses et luisantes (Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Biskra).
<i>Klebsiella spp.</i>		Morphologie de <i>Klebsiella spp.</i> , observée par coloration de Gram au grossissement 1000 à l'huile d'immersion. Les cellules sont des bacilles courts à Gram négatif, isolés ou regroupés en diplobacilles (Photo réalisée au Département de Biologie à l'Université de Biskra).

Les tests d'identification réalisés sur les différents isolats ont permis les résultats reportés sur le tableau 15.

Tableau 15 : Résultats de l'identification présomptive bactérienne

	<i>Klbs</i>	<i>Prot</i>	<i>Yers</i>	<i>Acin</i>	<i>Aero</i>	<i>Alca</i>	<i>Flav</i>	<i>Sten</i>	<i>Psdo</i>	<i>Stph</i>	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Baci</i>
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Mobilité	-	+	-	-	+	+	+/-	+	+	-	-	(-) ¹	+
Oxydase	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-
NO ₃ ⁻	+	+	+	-		+	-	NR	-	NR	NR	-	+/-
Indole	-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	NR	-	NR	NR	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	+	-	-	-	+	-	+	+	+/-	+	+	-	-
Mannitol	+	-	+	NR	+	-	-	-	NR	+	+	-	-
Gaz	+	+	-	NR	+	NR		+/-	NR	+	NR	-	-
Saccharose	+	-	+	NR	+	-	+	+/-	+	+/-	NR	+/-	+/-
H ₂ S	-	+	-	-	+/-	-	NR	-	-	-	-	-	-
Hémolyse	NR	+	NR	NR	+	-	NR	NR	NR	+	+	+	NR
VP	+	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	+/-	+	-
Esculine	NR	NR	+	NR	+	+	NR						
RM	-	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	+/-	+	+
Uréase	+	+	+	-	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	-	-
Citrate	+	+	-	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	+	NR	NR
ONPG	+	-	+	NR	NR								
LDC	+	-	-	-	NR	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
ODC	-	+/-	+/-	NR	NR								

Entr : Enterococcus, *List* : Listeria, *Stph* :Staphylococcus, *Acin* : Acinetobacter, *Prot* : Proteus, *Aero* : Aeromonas, *Psdo* : Pseudomonas, *Klbs* : Klebsiella, *Yers* : Yersinia, *Baci* : Bacillus, *Flav* : Flavobacterium, *Alca* : Alcaligenes, *Sten* : Stenotrophomonas.

1 : mobilité négative à 37°C, + = réaction positive, - = réaction négative, +/- = réaction variable selon les souches. **NR** :Non Réalisé

Le tableau 16 exprime les effectifs, les fréquences (notées f_i) et les pourcentages des laits contaminés en fonction de la nature des germes isolés :

Tableau 16 : Distribution des différentes bactéries isolées sur gélose sang cuit additionnée de Cefazoline

Germes	ni : Effectifs des laits contaminés	$f_i = \frac{ni}{104}$	% des laits Contaminés ($f_i \times 100$)
<i>Enterococcus spp.</i>	20	0,19231	19,23
<i>Acinetobacter spp.</i>	9	0,08654	8,65
<i>Aeromonas spp.</i>	8	0,07692	7,69
<i>Staphylococcus spp.</i>	6	0,05769	5,77
<i>Listeria spp.</i>	6	0,05769	5,77
<i>Pseudomonas spp.</i>	5	0,04808	4,81
<i>Bacillus spp.</i>	4	0,03846	3,85
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	3	0,02885	2,88
<i>Proteus spp.</i>	3	0,02885	2,88
<i>Yersinia spp.</i>	2	0,01923	1,92
<i>Klebsiella spp.</i>	2	0,01923	1,92
<i>Flavobacterium spp.</i>	1	0,00961	0,96
<i>Alcaligenes spp.</i>	1	0,00961	0,96

L'expression graphique du tableau 16 des fréquences est reportée sur la figure 15 :

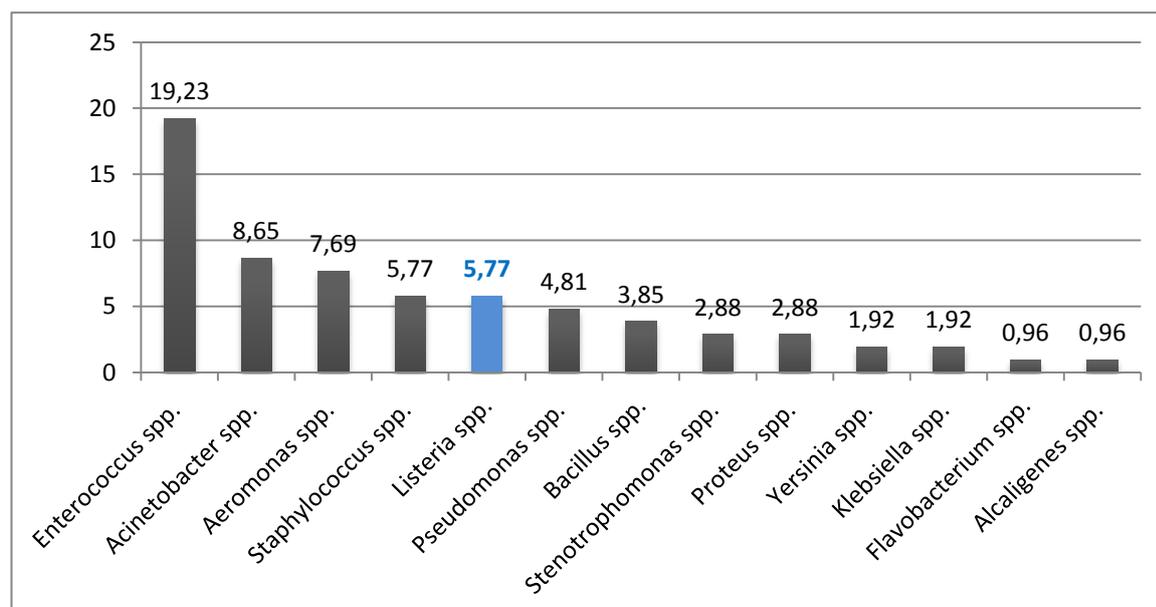


Figure 15 : Place de *Listeria spp.* au sein des bactéries isolées.

Nous avons noté six échantillons de laits analysés contaminés par *Listeria spp.* ; soit 5,77 %.

Nous remarquons également, que par rapport à la moyenne des laits contaminés ($m = 5,385$ et $\sigma = 5,0751$), *Listeria spp.* occupe une place centrale au sein de la population bactérienne psychrotrophe, avec un effectif égal six. Cette valeur, proche de la moyenne, indique un comportement moyen des *Listeria* par rapport aux germes isolés : Elle n'est pas abondante comme *Enterococcus* ($n_i = 20$) ni rare comme *Flavobacterium* ($n_i = 1$).

C'est un taux comparable par rapport à ceux cités par d'autres auteurs. Les études ont montré différents niveaux de contamination par *L. monocytogenes* dans le lait cru : 0% en Italie et en Suisse, 1% en Suède, 7% aux Etats Unis d'Amérique, 12% au Canada, 13% au Brésil et 2% en Corée (Ha *et al.*, 2002 ; Jemmi et Stephan 2006). L'incidence de *Listeria spp.* est de 2,2% en Iran (Moshtaghi et Mohamad, 2007) et de 6% en Turquie (Vardar-Ünlü *et al.*, 1998).

D'autres auteurs ont travaillé sur des PPC et ont tous observé une contamination à *L. monocytogenes*. Nous les citons afin de marquer l'importance du risque *Listeria* dans les denrées alimentaires :

- Sant'Ana *et al.* (2011), ont relevé, à São Paulo (Brésil) 3,1 % de contamination sur un total de 512 échantillons. Seuls, les sérotypes 1/2b et 4b ont été isolés dans cette étude.
- Aury *et al.*, en France, ont mesuré une prévalence à *L. monocytogenes* de 30,9 %. Ils ont noté une augmentation du risque de contamination par *L. monocytogenes* quand les conditions d'hygiène ne sont pas respectées.
- Dans la province d'Ispahan (Iran), Rahimi *et al.* (2010) ont analysés 594 échantillons de laits de brebis sur une période allant de Mars 2007 à Septembre 2009. *L. monocytogenes* a été isolée dans 32,7 % des cas. *L. innocua* et *L. seeligeri* ont été isolées à 58,2% et à 9,1 % respectivement.
- Durant la période de 5 ans qui s'est étalée de 2003 à 2007 (France), Nucera *et al.* (2010), ont isolé 300 souches de *L. monocytogenes* à denrées alimentaires dont les produits laitiers. Les sérotypes identifiés par électrophorèse en champs pulsé étaient : 1/2a (45 %), 1/2c (22 %), 4b/4e (16 %) et non typables (5 %).

En Algérie, comme cela a précédemment été noté, peu d'études ont été réalisées pour estimer l'incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru bovin :

L'étude réalisée par Hamdi *et al.* (2007) a révélé 2,61 % de *L. monocytogenes* dans 153 échantillons de laits de ferme récoltés dans les seules régions d'Alger et de Blida.

Cependant dans une récente étude, sur des aliments autres que le lait cru de vaches, menée par Bouayad L. (2012) sur des PPC, dans la région d'Alger, elle a observée une présence de *Listeria spp.* dans 21 échantillons sur un total de 227. Parmi les 21 échantillons *Listeria*-positifs, elle note 06 cas de *L. monocytogenes*, 11 de *L. innocua*, 03 de *L. ivanivii* et 01 de *L. welshimeri*.

Ces résultats dénotent la dangereuse présence de *L. monocytogenes* aussi bien dans le lait cru que dans les autres produits alimentaires soit en Algérie soit dans le reste du monde (voir tableau 17).

Tableau 17 : Distribution comparée de *Listeria spp.* et *L. monocytogenes* dans le lait cru observée dans divers pays.

Pays	<i>L. monocytogenes</i> (%)	<i>Listeria spp.</i> (%)	Référence
Italie	0	-	Massa <i>et al.</i> (1990)
Suisse	0	-	Stephan et Bühler (2002)
Suède	1	-	Waak <i>et al.</i> (2002)
Etats-Unis d'Amérique	7	-	Van Kessel <i>et al.</i> (2004)
Canada	12	-	Farber <i>et al.</i> (1988)
Brésil	13	-	Moura <i>et al.</i> (1993)
Corée	2	-	Ha <i>et al.</i> (2002)
Algérie	2,61 ^a	1,95 ^b	^a Hamdi <i>et al.</i> (2007), ^b Lebres et Guetarni (2007)
Iran	-	2,2	Moshtaghi et Mohamadpour (2007)
Turquie	-	6	Vardar-Ünlü <i>et al.</i> (1998)
La présente étude	-	5,76	Boubendir et Hamidechi (2011)

L'incidence de *Listeria spp.* dans le lait cru est associée à sa prévalence dans les échantillons fécaux. La procédure de la traite induit la contamination alors que le manque d'hygiène augmente la contamination microbienne du lait. Les microorganismes, incluant *Listeria spp.*, peuvent contaminer le lait par les pis sales, les tétées, et les équipements utilisés pour la traite (Husu 1990 ; Husu *et al.*, 1990).

Le nombre d'échantillons positifs pour les bactéries psychrotrophes pathogènes telles que : *Listeria spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Proteus spp.*, *Yersinia spp.* et *Klebsiella spp.* est inférieur à celui des échantillons à partir desquels ont été isolés *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.* et *Aeromonas spp.*

Les animaux cliniquement sains peuvent excréter des organismes pathogènes responsables d'empoisonnement alimentaire. Skovgaard (1990) a établi une liste de 21 pathogènes qui peuvent être introduits à la chaîne alimentaire via les animaux domestiques et il a formulé que le site de production primaire dans la ferme est probablement leur source essentielle dans le produit final. Parmi ces pathogènes : *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolytica*, *Mycobacterium bovis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, etc.

Cependant, les genres *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Alcaligenes spp.*, et *Flavobacterium spp.* sont des agents d'altération. En effet, durant le stockage à froid, après collecte du lait, les populations de bactéries psychrotrophes dominent la microflore, et leurs enzymes extracellulaires, essentiellement les protéases et les lipases, contribuent en l'altération des produits laitiers (Hantsis-Zacharov et Halpern 2007). Si de nombreuses bactéries psychrotrophes sont très facilement détruites lors d'un traitement par la chaleur, les lipases et surtout les protéases sont pour la plupart beaucoup plus thermorésistantes. Certaines résistent quelques dizaines de secondes à des températures de +140 à +150°C et ne seront donc pas détruites, par exemple, lors de la stérilisation du lait (Bornert 2000).

3.2. Séquençage ARNr 16S et Analyse bioinformatique moléculaire

Les résultats du séquençage des 10 souches peuvent être consultés en annexes C4.1 à C.4.10. Nous avons traité ses séquences au moyen d'outils bioinformatiques tels que BlastN et MEGA 4.0 pour tirer les informations nécessaires à l'établissement des parentés phylogénétiques entre ces bactéries.

BlastN a permis de comparer nos séquences à l'ensemble des séquences existantes sur GenBank. Les résultats du blasting sont les suivants :

Tableau 18 : Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank

Séquence inconnue	Souche proposée par GenBank	Score	E-value	% identité
1	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	1223	0	99
2	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	1201	0	99
3	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	1225	0	99
4	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	1199	0	99
5	<i>Enterococcus camelliae strain FP15-1</i>	752	0	99
6	<i>Acinetobacter calcoaceticus NCCB 22016</i>	1131	0	100
7	<i>Aeromonas veronii</i>	1186	0	99
8	<i>Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071</i>	1074	0	98
9	<i>Bacillus mojavenensis strain IFO15718</i>	1105	0	99
10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1452	0	99

Nous constatons que pour toutes les séquences inconnues qui sont les nôtres, GenBank, via le programme BlastN réalise un alignement en utilisant ses propres séquences et propose celle qui présente la meilleure identité avec la nôtre en calculant un score qui correspond au nombre de nucléotides identiques chez les deux séquences. Ce score peut être traduit sous forme de pourcentage d'identité (%id). La valeur calculée de E-value indique la probabilité que le résultat de cet alignement a eu lieu par hasard. Donc plus cette valeur est proche du zéro et mieux c'est. Or tous les alignements ont abouti à des valeurs nulles de la E-value ; ce qui exprime que les identités retrouvées entre nos séquences et celles proposées par GenBank ne sont pas dues au hasard.

Sur les 10 souches alignées, quatre d'entre elles sont *Enterococcus faecalis strain JCM 5803* et une seule correspond à l'espèce *Enterococcus camelliae strain FP15-1*. Les autres souches ont été identifiées à *Acinetobacter calcoaceticus NCCB 22016*, *Aeromonas veronii*, *Pseudomonas aeruginosa strain DSM 5007*, *Bacillus mojavenensis strain IFO15718* et

Stenotrophomonas maltophilia.

Le tableau 19 résume l'origine géographique des 10 souches identifiées moléculairement:

Tableau 19 : Origines des 10 souches séquencées et Blastées

Souche	Nom systématique de GenBank	Origine géographique
1	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	El Hadjeb : Biskra
2	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	Grarem : Mila
3	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	Grarem : Mila
4	<i>Enterococcus faecalis strain JCM 5803</i>	Grarem : Mila
5	<i>Enterococcus camelliae strain FP15-1</i>	Seliana : Mila
6	<i>Acinetobacter calcoaceticus NCCB 22016</i>	Ferdoua : Mila
7	<i>Aeromonas veronii</i>	Seliana : Mila
8	<i>Pseudomonas aeruginosa strain DSM 50071</i>	Sidi Okba : Biskra
9	<i>Bacillus mojavensis strain IFO15718</i>	Sidi Okba : : Biskra
10	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Doucene : : Biskra

Les relations phylogénétiques entre les 10 souches sont retracées au moyen du programme MEGA 4.0. Celui-ci va, réaliser les étapes suivantes :

- un alignement multiple des 10 séquences,
- calcul de la matrice des distances (tableau 20),
- création de l'arbre phylogénétique avec une option du Bootstrap (figure 16).

Tableau 20 : Matrice des distances (logiciel MEGA 4.0)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
2	0,000								
3	0,000	0,000							
4	0,000	0,000	0,000						
5	0,000	0,000	0,000	0,000					
6	0,186	0,186	0,186	0,186	0,186				
7	0,560	0,560	0,560	0,560	0,560	0,585			
8	0,562	0,562	0,562	0,562	0,562	0,583	0,122		
9	0,573	0,573	0,573	0,573	0,573	0,585	0,239	0,239	
10	0,173	0,173	0,173	0,573	0,573	0,117	0,580	0,573	0,580

1,2,3,4 : *E. faecalis*, **5 :** *E. camelliae*, **6 :** *A. calcoaceticus*, **7 :** *A. veronii*, **8 :** *P. aeruginosa*, **9 :** *B. mojavensis*, **10 :** *S. maltophilia*

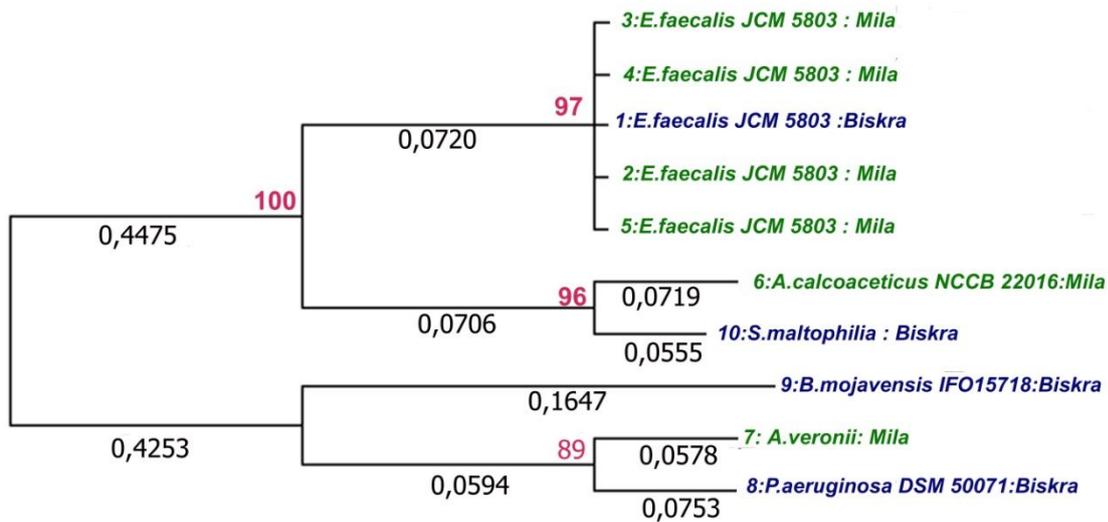


Figure 16 : Phylogramme avec Bootstrap des 10 souches construit selon l'algorithme NJ.

Nous constatons que les cinq souches *Enterococcus* sont regroupées ensemble dans un même clade avec un bootstrap de 97 % ; ce qui dénote une forte relation phylogénétique entre ces bactéries. Les distances nulles entre ces souches sont synonymes d'une forte identité génotypique. Il n'y a pas eu de forte variabilité intergénétique au sein de ce groupe et ce quelque soit l'origine géographique.

Le deuxième clade est constitué de *Acinetobacter calcoaceticus* et *Stenotrophomonas maltophilia*. Les deux germes sont séparés avec une distance de 0,117. C'est la distance la plus faible observée après celle des cinq souches *Enterococcus* (distances nulles).

Le troisième clade est constitué de *Bacillus mojavensis* associé avec la paire bactérienne *Aeromonas veronii*/*Pseudomonas aeruginosa*. Celle-ci constitue à elle seule un clade exprimant leur forte liaison génétique.

Il est également possible de diviser cet arbre en deux grands groupes phylogénétiquement distincts:

– **Groupe 1 :**

- | | |
|---|--------------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 | El Hadjeb : Biskra |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 | Grarem : Mila |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 | Grarem : Mila |
| <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 | Grarem : Mila |
| <i>Enterococcus camelliae</i> FP15-1 | Seliana : Mila |
| <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> NCCB 22016 | Ferdoua : Mila |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Doucene : Biskra |

– **Groupe 2 :**

- | | |
|---|--------------------|
| <i>Aeromonas veronii</i> | Seliana : Mila |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> DSM 50071 | Sidi Okba : Biskra |
| <i>Bacillus mojavensis</i> IFO15718 | Sidi Okba : Biskra |

3.3. Incidence géographique

Nous avons noté, compte tenu de la situation géographique, que l'incidence de *Listeria spp.* (4,41 %) est plus faible à Biskra comparativement à Mila (8,33 %). Cette différence pourrait être associée à la différence climatique plutôt qu'aux facteurs liés à la traite ou aux conditions d'hygiène, car sur ce plan, aucune différence entre les deux wilayas n'a d'ailleurs été observée (Tableau 21).

Nous n'avons pas observé de différence significative entre Mila et Biskra du point de vue hygiénique, consommation des PPC ou conditions d'élevage. Cependant la différence dans l'incidence bactérienne entre ces deux régions serait liée aux facteurs environnementaux tels que la température (Moyenne à Mila : 18,58°C, Moyenne à Biskra : 22,38°C selon les relevés météorologiques de Constantine et de Biskra) et l'humidité relative (Mila : 57%, Biskra : 45,02%).

Enterococcus spp. est le genre le plus rencontré dans les deux régions avec une incidence de 25 % à Mila et 16,17 % à Biskra. Les incidences de *Aeromonas spp.* (13,9%) et *Proteus spp.* (8,33%) sont plus importantes à Mila par rapport à Biskra. Par contre, l'incidence de *Staphylococcus spp.* (8,82%) et *Acinetobacter spp.* (10,29%) sont plus importantes à Biskra. D'autre part, il n'y a pas de différence très significative dans l'incidence de *Pseudomonas spp.* dans les deux régions (5,56 % et 4,41 % à Mila et à Biskra respectivement), (Figure 17).

Tableau 21 : Distribution géographique bactérienne (%) à Mila et à Biskra

Genres bactériens	Mila	Biskra
<i>Acinetobacter spp.</i>	5,55	10,29
<i>Aeromonas spp.</i>	13,9	4,41
<i>Alcaligenes spp.</i>	0	0,96
<i>Enterococcus spp.</i>	25	16,17
<i>Flavobacterium spp.</i>	0	0,96
<i>Klebsiella spp.</i>	0	1,92
<i>Listeria spp.</i>	8,33	4,41
<i>Proteus spp.</i>	8,33	0
<i>Pseudomonas spp.</i>	5,55	4,41
<i>Staphylococcus spp.</i>	0	8,82
<i>Stenotrophomonas spp.</i>	0,96	1,92
<i>Yersinia spp.</i>	0	1,92
<i>Bacillus spp.</i>	0	3,84

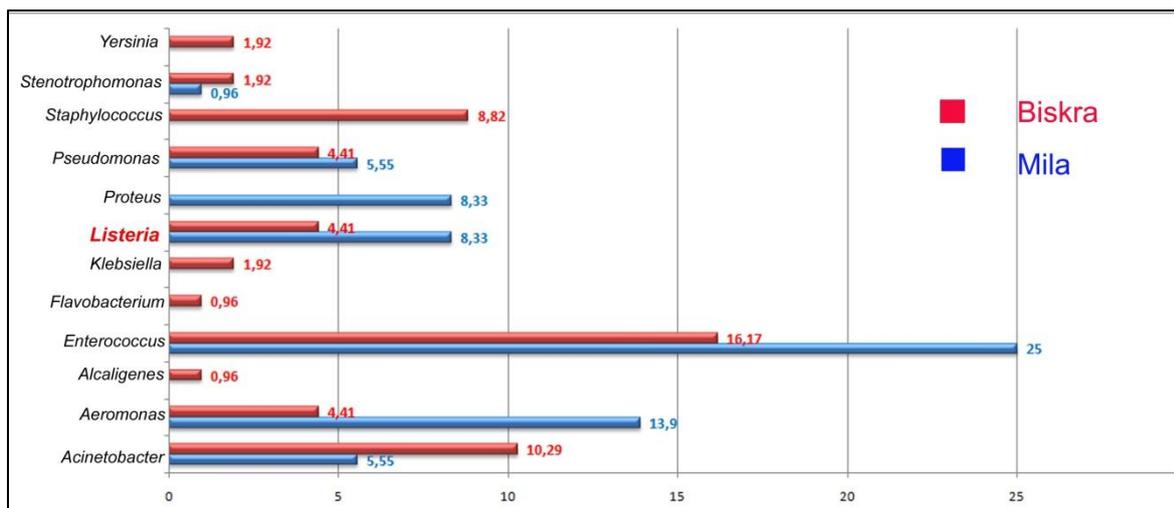


Figure 17 : Incidence géographique de *Listeria spp.* et des bactéries psychrotrophes dans les régions de Mila et de Biskra.

Il faut noter que rares sont les études ayant été conduites dans le but de montrer l'effet des facteurs environnementaux sur la contamination du lait cru. Rea *et al.* (1992), ont montré dans leur étude l'importance des facteurs de l'environnement par rapport à la contamination du lait cru (en Irlande) par certains pathogènes dont *Listeria spp.* De plus, Gaya *et al.* (1996), en Espagne, ont rapporté que l'incidence de *Listeria spp.* était plus faible au niveau des fermes de montagne comparativement à celles situées sur les plateaux. Jarad *et al.* quant à eux affirment, dans leur travail, que la majorité des cas de contamination animale par *L. monocytogenes* apparaît dans les régions géographiques froides telles que les pays Nord-Américains et les pays Nord-Européens.

3.4. Incidence saisonnière

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

Ainsi, notre étude a apporté un renseignement supplémentaire quant à l'incidence saisonnière de *L. monocytogenes*.

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

Certains auteurs (Waak *et al.*, 2002 ; Broseta *et al.*, 2003) ont rapporté que la contamination du lait cru par *Listeria* est d'habitude plus courante en hiver, vraisemblablement à cause de l'alimentation par ensilage qui est la plus répandue en cette saison dans beaucoup de parties du monde. Kalac (2011) affirme dans son étude que l'ensilage est une riche source de contamination par des bactéries indésirables telles que *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* et *Clostridium tyrobutyricum*. Il ajoute que l'occurrence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage est associée aux processus bactériens anaérobies qui abiment la qualité hygiénique et

nutritionnelle des ensilages et que la croissance de la bactérie devient importante lorsque la tension en oxygène est élevée et lorsque les valeurs de pH avoisinent 4,4. Il ajoute à ces facteurs, la mauvaise qualité de l'ensilage due à une faible acidité à cause d'une fermentation lactique inappropriée, ou une détérioration aérobie.

Selon les analyses statistiques de Vilar *et al.* (2007), la relation entre la mauvaise qualité de l'ensilage (due au pH élevé) et la présence de *L. monocytogenes* dans l'ensilage sont confirmées. Ils notent des taux d'isolement de 29,5 % contre 6,2 % pour un pH au dessus ou en dessous de 4,5 respectivement. Ces observations sont aussi confirmées par de nombreux auteurs qui ont montré une augmentation du portage des *Listeria spp.* en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent : Le portage de *Listeria spp.* existe dans la plupart des troupeaux (vaches), avec un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons (AFSSA, 2000).

Pour leur part, Vagner et McLanchlin (2008), considèrent que les affections des vaches par *L. monocytogenes* atteignent leur pic au printemps et ajoutent que les *Listeria spp.* peuvent supporter les stress des variations saisonnières extrêmes allant des températures avoisinant la congélation en hiver à celles d'extrêmes chaleurs en été.

De plus, certaines pratiques alimentaires, telles que l'usage d'ensilage altéré, pourraient favoriser la variation saisonnière de l'occurrence de *Listeria spp.* dans le lait cru (Farber et Peterkin, 1991). D'autre part, le risque de contamination par les matières fécales paraît augmenté durant la saison où les vaches sont regroupées ensemble à l'intérieur, le nombre d'excréteurs de matière fécale étant élevé et les vaches se nourrissent ensemble d'ensilage (Husu 1990). Dans cette même idée, Vagner et McLanchlin (2008), affirment que 5,3 à 45 % des vaches, en Australie, sont des porteuses fécales de *L. monocytogenes* et que la relation entre l'alimentation par ensilage et le développement d'une listériose animale au sein du troupeau, devient plus importante lorsque le pH est supérieur à 5,5 et lorsque l'ensilage a longtemps été exposé aux conditions aérobies.

D'autre part, une augmentation du taux d'isolement de *Listeria spp.* entre décembre 2008 (25%) et janvier 2009 (40%) a été enregistrée (Figure 18). Durant cette période, la température et l'humidité relative atteignent 9°C et 94 % respectivement. Au même temps, une diminution perceptible du taux d'isolement de *Enterococcus spp.* a été observée. Par conséquent, un effet antagoniste de *Enterococcus spp.* contre *Listeria spp.* peu être suggéré sauf pour le mois de janvier 2010 où *Listeria spp.* a montré une distribution de 33,33 % au même où *Enterococcus spp.*, son antagoniste, a montré un taux de 66,66 %. La forte présence des *Listeria spp.* en janvier 2010 à côté des *Enterococcus spp.*, serait due au fait que durant ce mois la température et l'humidité relative ont enregistré 12°C et 54 % respectivement, suggérant que les facteurs environnementaux peuvent jouer un rôle dans la contamination du lait.

En effet, plusieurs recherches conduites ont confirmé l'effet inhibiteur des bactériocines produites par les souches d'*Enterococcus* contre la croissance et le développement des *Listeria* (Gaya *et al.*, 1996 ; Elotmani *et al.*, 2002 ; Laukova et Marekova, 2002 ; Achemchem *et al.*, 2004). De plus, ajoutent-ils, *Enterococcus spp.* confère une protection au lait contre la contamination bactérienne par la production de peroxyde d'hydrogène, l'acidification du milieu par production d'acide lactique et la compétition nutritionnelle.

Pour le cas des autres bactéries, aucune incidence saisonnière évidente n'a été observée. Il s'agit des cas de : *Enterococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, et *Pseudomonas spp.* (Figure 18). Ces bactéries ont été isolées durant les quatre saisons de l'année.

A la différence des autres bactéries, il n'existe pas de saisonnalité mensuelle qui apparaisse nettement en matière d'isolement de *Proteus spp.* Sa distribution montre toutefois une augmentation dans les mois chauds (en été et en début d'automne) de l'année mais ni en hiver ni au printemps. Ce membre de la famille des *Enterobacteriaceae* est stimulé par les températures élevées, et il est aussi un indicateur de la contamination fécale du lait.

Concernant *Staphylococcus spp.*, nous avons noté aucune incidence saisonnière hivernale plus importante (12,9 %) que celle des saisons de printemps et d'automne, où des taux d'isolement de 3,33 % ont été enregistrés. Durant la saison d'été, aucune contamination à *Staphylococcus spp.* n'a été notée ; ce qui suggérerait que l'alimentation à base d'ensilage frais, disponible dans cette saison, pourrait influencer l'incidence staphylococcique (Rea *et al.*, 1992).

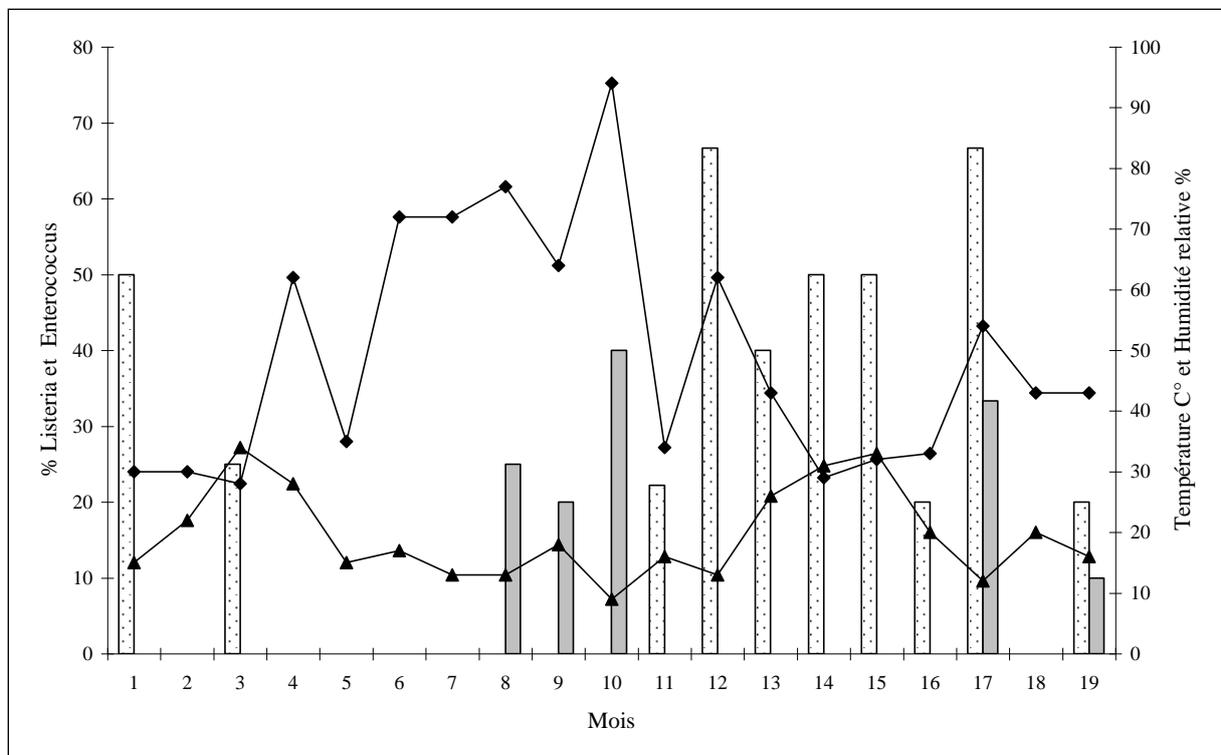


Figure 18 : Incidence saisonnière de *Listeria spp.* dans le lait cru comparée à *Enterococcus spp.*

Mois 1=Avril 2008, Mois 19 = Mars 2010.

Enterococcus spp. (Bâtonnets claires) , *Listeria spp.* (Bâtonnets sombres)

▲ : Température; ◆ : Humidité relative.

D'autres auteurs ont montré l'influence saisonnière en travaillant sur d'autres aliments autres que le lait cru de vaches. Ainsi, Ben Embarek 1994 ; Dillon *et al.* 1994 ; Eklund *et al.* 1995, Pierre et Veit, 1996 ; Brett *et al.* 1998), ont montré que certains poissons et coquillages pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes*. La fréquence de contamination des poissons fumés varie de 0 à 50% selon l'origine géographique du poisson. Le niveau de contamination varie en fonction de l'origine (sauvage ou élevage) et de la saison.

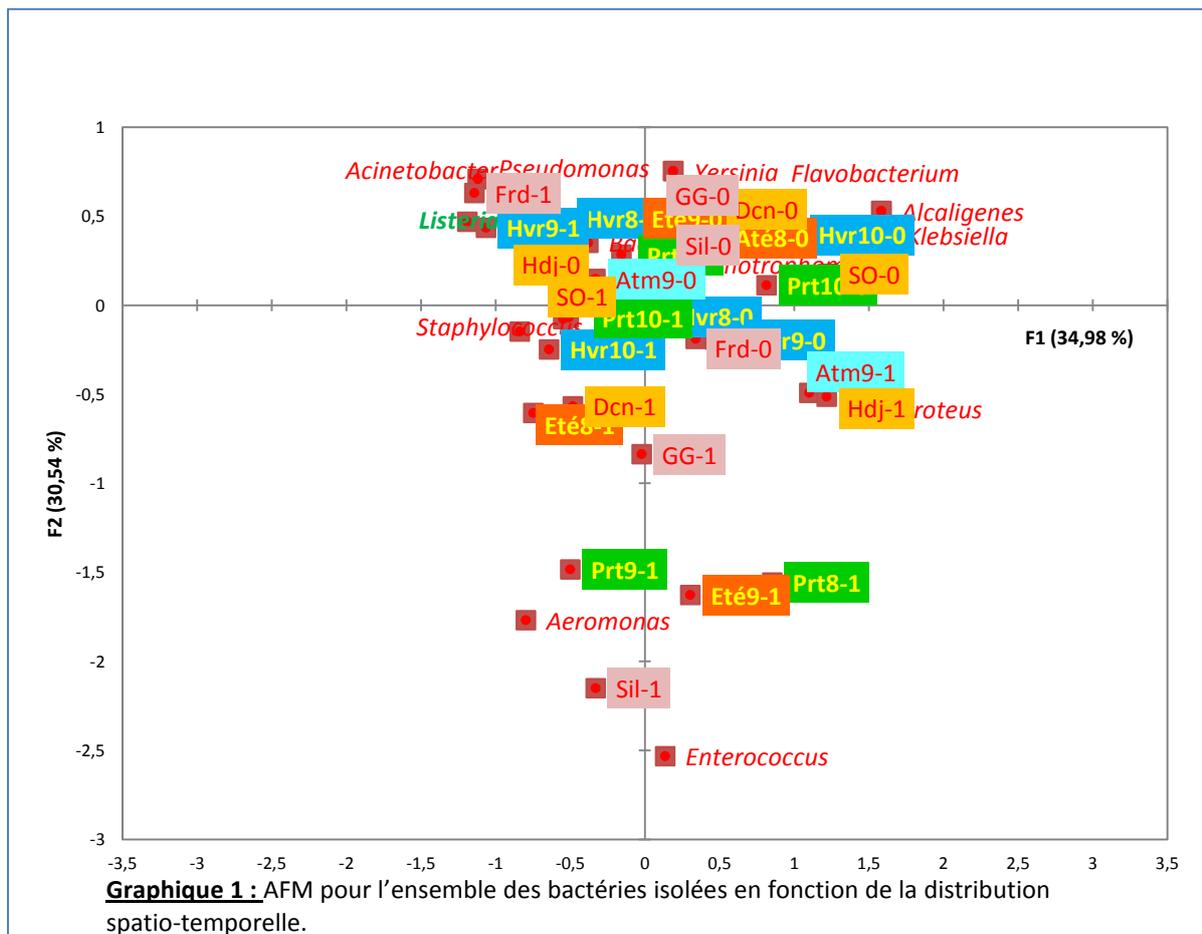
3.5. Incidence spatio-temporelle

L'AFM nous a permis de faire ressortir les résultats des distributions bactériennes, en particulier *L. monocytogenes*, en fonction de la dimension temps (la saison de prélèvement) et de la situation géographique (origine du prélèvement).

D'après le graphique 1, nous constatons une forte association spatio-temporelle des différents germes. En effet, la presque totalité des bactéries forment un nuage de points unique sur la partie Nord du graphique par rapport à l'axe horizontal. Ceci explique un comportement similaire (pour ne pas dire identique) des différentes bactéries par rapport aux deux facteurs spatio-temporels. La qualité organoleptique du lait serait à l'origine d'une telle association. Cependant, nous relevons certains cas particuliers, notamment celui d'*Enterococcus* qui semble beaucoup plus associé à l'espace de Siliana (Mila) et aux deux saisons Printemps et été.

Listeria spp. quant à elle, montre une association plus nette avec l'espace Ferdoua (Mila) et les Hivers des années 2008 et 2009. Elle présente une faible association avec l'espace El-Hadjeb (Biskra) comparativement à Ferdoua.

Les bactéries associées à *Listeria spp.* dans les dimension spatio-temporelles Ferdoua-Hivers sont *Acinetobacter spp.* et *Pseudomonas spp.*



La matrice de similarité calculée selon le coefficient de Jaccard (Tableau 22) a permis de classer les bactéries en classes en fonction des dimensions espace-temps :

Tableau 22 : Matrice de similarité globale

	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Stph</i>	<i>Acin</i>	<i>Prot</i>	<i>Aero</i>	<i>Psdo</i>	<i>Klbs</i>	<i>Yers</i>	<i>Baci</i>	<i>Flav</i>	<i>Alca</i>	<i>Sten</i>
<i>Entr</i>	1												
<i>List</i>	0,333	1											
<i>Stph</i>	0,385	0,400	1										
<i>Acin</i>	0,286	0,556	0,500	1									
<i>Prot</i>	0,308	0,182	0,100	0,100	1								
<i>Aero</i>	0,750	0,417	0,500	0,364	0,167	1							
<i>Psdo</i>	0,308	0,444	0,375	0,833	0,000	0,400	1						
<i>Klbs</i>	0,154	0,100	0,125	0,125	0,333	0,000	0,000	1					
<i>Yers</i>	0,167	0,250	0,143	0,333	0,000	0,222	0,400	0,000	1				
<i>Baci</i>	0,333	0,500	0,429	0,429	0,000	0,444	0,500	0,000	0,500	1			
<i>Flav</i>	0,167	0,250	0,143	0,333	0,000	0,222	0,400	0,000	1,000	0,500	1		
<i>Alca</i>	0,167	0,000	0,000	0,000	0,167	0,000	0,000	0,667	0,000	0,000	0,000	1	
<i>Sten</i>	0,231	0,500	0,250	0,111	0,125	0,300	0,125	0,000	0,000	0,333	0,000	0,000	1

Entr : Enterococcus, *List* : Listeria, *Stph* :Staphylococcus, *Acin* : Acinetobacter, *Prot* : Proteus, *Aero* : Aeromonas, *Psdo* : Pseudomonas, *Klbs* : Klebsiella, *Yers* : Yersinia, *Baci* : Bacillus, *Flav* : Flavobacterium, *Alca* : Alcaligenes, *Sten* : Stenotrophomonas.

De cette matrice va découler une matrice de distances calculée à partir de la relation : Distance = 1 - similarité. Ces distances représentent les dissimilarités retrouvées entre toutes les paires bactériennes en fonction de leurs coordonnées spatio-temporelles respectives (Tableau 23).

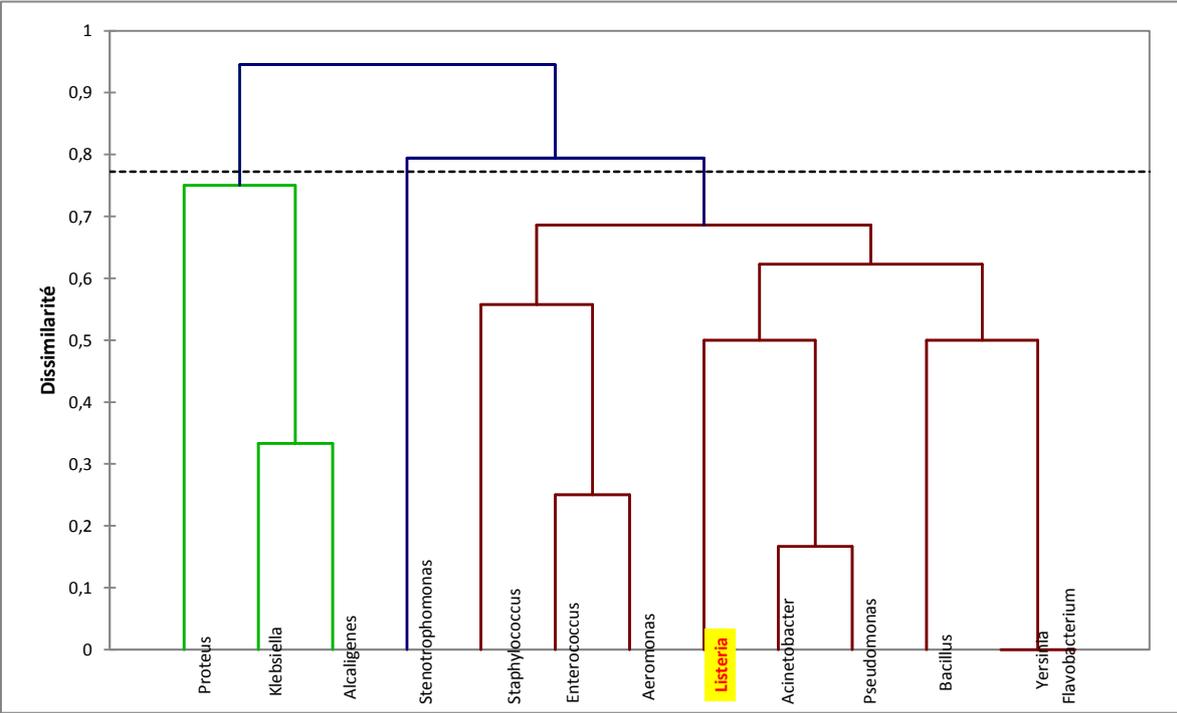
Tableau 23 : Matrice des distances

	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Stph</i>	<i>Acin</i>	<i>Prot</i>	<i>Aero</i>	<i>Psdo</i>	<i>Klbs</i>	<i>Yers</i>	<i>Baci</i>	<i>Flav</i>	<i>Alca</i>	<i>Sten</i>
<i>Entr</i>	0												
<i>List</i>	0,667	0											
<i>Stph</i>	0,615	0,600	0										
<i>Acin</i>	0,714	0,444	0,500	0									
<i>Prot</i>	0,692	0,818	0,900	0,900	0								
<i>Aero</i>	0,250	0,583	0,500	0,636	0,833	0							
<i>Psdo</i>	0,692	0,556	0,625	0,167	1,000	0,600	0						
<i>Klbs</i>	0,846	0,900	0,875	0,875	0,667	1,000	1,000	0					
<i>Yers</i>	0,833	0,750	0,857	0,667	1,000	0,778	0,600	1,000	0				
<i>Baci</i>	0,667	0,500	0,571	0,571	1,000	0,556	0,500	1,000	0,500	0			
<i>Flav</i>	0,833	0,750	0,857	0,667	1,000	0,778	0,600	1,000	0,000	0,500	0		
<i>Alca</i>	0,833	1,000	1,000	1,000	0,833	1,000	1,000	0,333	1,000	1,000	1,000	0	
<i>Sten</i>	0,769	0,500	0,750	0,889	0,875	0,700	0,875	1,000	1,000	0,667	1,000	1,000	0

Entr : Enterococcus, *List* : Listeria, *Stph* :Staphylococcus, *Acin* : Acinetobacter, *Prot* : Proteus, *Aero* : Aeromonas, *Psdo* : Pseudomonas, *Klbs* : Klebsiella, *Yers* : Yersinia, *Baci* : Bacillus, *Flav* : Flavobacterium, *Alca* : Alcaligenes, *Sten* : Stenotrophomonas.

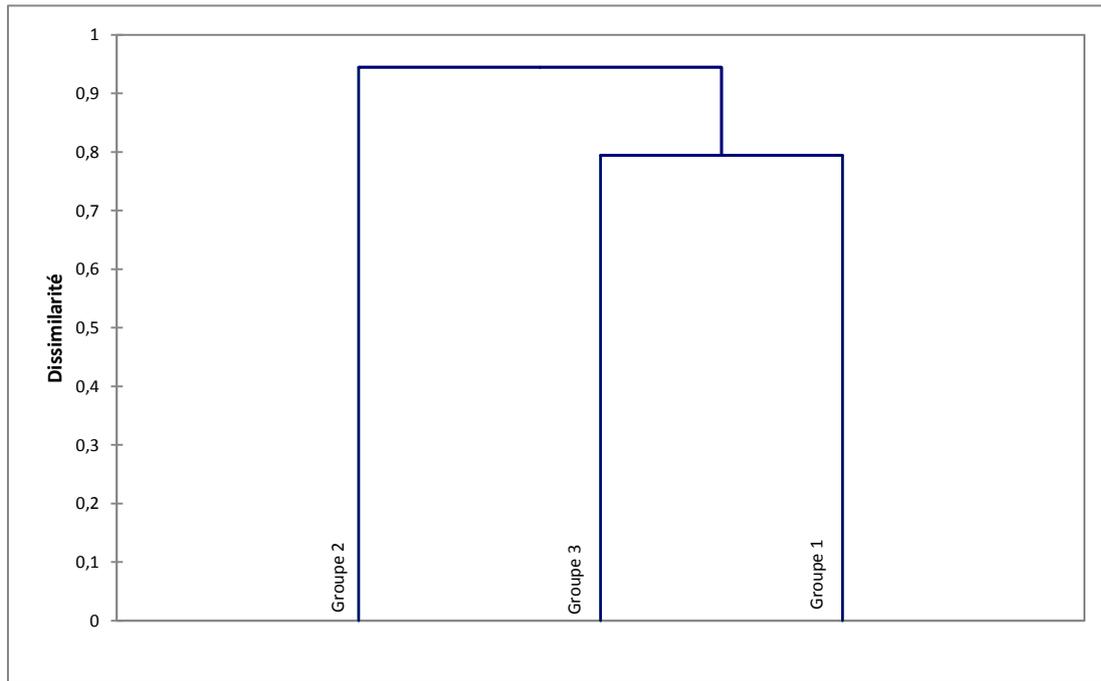
La classification hiérarchique ascendante (CHA) de l'ensemble des bactéries est représentée sur un dendrogramme (Graphique 2) construit selon la méthode UPGMA à partir de la matrice des distances. Le dendrogramme a permis d'identifier trois groupes bactériens de

diversité spatio-temporelle (Graphique 3). Ces groupes se distinguent à une distance proche de 0,8 ; soit une dissimilarité spatio-temporelle de 80 %



Graphique 2 : Classification hiérarchique Ascendante bactérienne selon UPGMA.

En ne tenant compte que du centre de gravité de ces trois groupes la CHA révèle une classification plus simplifiée de la classification précédente (graphique 3).



Graphique 3 : Classification des trois groupes bactériens selon leurs barycentres spatio-temporels

Les résultats de ce graphique sont représentés dans le tableau 24 qui montre la composante bactérienne des trois groupes microbiens hiérarchisés par UPGMA.

Le groupe 1 est composé de neuf individus. Ce groupe se caractérise par une absence quasi-totale en Hiver 2008 (excepté *Listeria spp.*), mais plus importante en Hiver 2009. Géographiquement, ce groupe a montré une présence plus importante à Sidi Okba (Biskra) où tous les individus constitutifs de ce groupe ont été isolés. Ils sont plus absents à Ferdoua et à Siliana (Mila). Ce groupe est étroitement corrélé aux composantes spatio-temporelles définies par Sidi Okba et Hiver 2009.

La distance moyenne des neuf individus au centre de gravité de ce groupe étant de 0,760. Cela exprimerait une certaine diversité spatio-temporelle à l'intérieur de ce groupe : les différents individus n'étant pas concentrés au tour du centre de gravité ; ce qui aurait expliqué une distribution spatio-temporelle plus étroite.

Le groupe 2 est constitué de trois individus ; à savoir *Proteus spp.*, *Klebsiella spp* et *Alcaligenes spp.*

Par rapport à la composante saisonnière, ce groupe est plus présent en Automne 2009 et géographiquement plus présent à El-Hadjeb (Biskra). Nous pouvons donc associer ce groupe aux dimensions spatio-temporelles constituées de El-Hadjeb de Biskra et Automne 2009.

Comparativement au groupe 1, le groupe 2 est plus concentré au tour de son barycentre ; avec

une moyenne de 0,568. Ceci serait du au comportement spatio-temporel encore plus similaire au sein des individus constitutifs de ce groupe.

Le groupe 3, constitué uniquement de *Stenotrophomonas spp.*, est présent aux Hivers 2008 et 2010. Géographiquement, il est présent à Doucene (Biskra) et à Grerem (Mila).

Une corrélation spatio-temporelle peut être attribuée à *Stenotrophomonas spp.* définie par les composantes Doucene-Grerem et Hivers 2008-2009. Cette bactérie est la seule à montrer une dispersion spatio-temporelle plus variée. Ceci expliquerait son comportement écologique plus adapté que les deux autres groupes par rapport au temps et par rapport à l'espace.

Tableau 24 : Résultats de la dispersion spatio-temporelle par groupe

Classe	1	2	3
Distance moyenne au barycentre	0,760	0,568	0,000
	<i>Enterococcus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
	<i>Listeria</i>	<i>Klebsiella</i>	
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Alcaligenes</i>	
	<i>Acinetobacter</i>		
	<i>Aeromonas</i>		
	<i>Pseudomonas</i>		
	<i>Yersinia</i>		
	<i>Bacillus</i>		
	<i>Flavobacterium</i>		

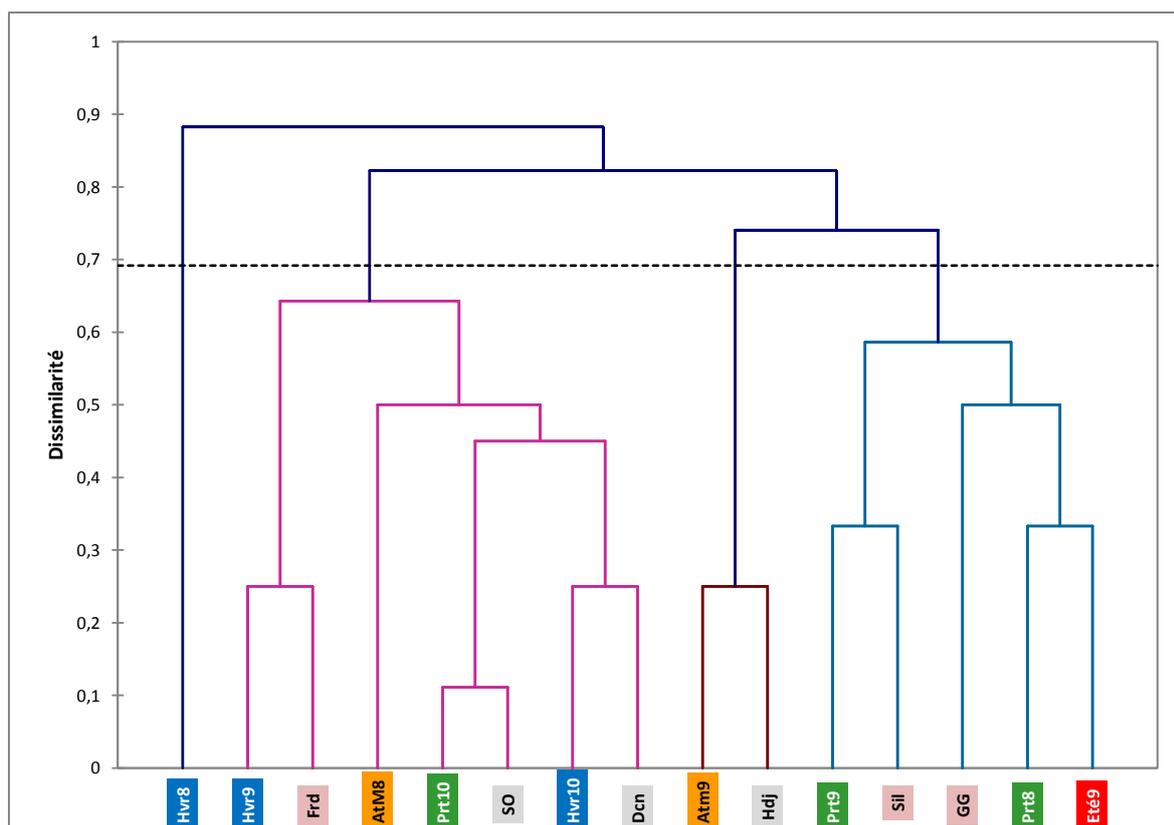
Les distances inter-groupes représentées dans le tableau 25 montrent une similarité dans la distribution spatio-temporelle entre les groupes 1 et 3 (distance = 1,218). Le groupe 2 est plus éloigné.

La diversité spatio-temporelle à l'intérieur du groupe 1 précédemment observée (0,760) corrobore l'analogie dans le comportement spatio-temporel de ce groupe avec le groupe 3 dans lequel nous avons relevé une forte dispersion spatio-temporelle.

Tableau 25 : Distances entre les barycentres des trois groupes bactériens

	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Groupe 1	0		
Groupe 2	1,588	0	
Groupe 3	1,218	1,504	0

La CHA des dimensions spatio-temporelles en fonction de la diversité bactérienne a révélé la présence de quatre dimensions différentes (Graphique 4).



Graphique 4 : Classification hiérarchique ascendante selon les dimensions spatio-temporelles

Les quatre groupes hiérarchisés par UPGMA sont composés de plusieurs dimensions spatio-temporelles comme l'indique le tableau suivant :

Tableau 26 : Résultats par groupes spatio-temporels

Groupes spatio-temporels	1	2	3	4
Occurrences des objets	1	7	5	2
Variance intra-groupe	0,000	0,595	0,512	0,126
	Hiver 2008	Hiver 2009	Printemps 2008	Automne 2009
		Hiver 2010	Printemps 2009	El Hadjeb
		Printemps 2010	Eté 2009	
		Automne 2008	Grarem	
		Doucene	Siliana	
		Sidi Okba		
		Ferdoua		

Le groupe 1 spatio-temporel est exclusivement formé de la composante temporelle Hiver 2008 durant la quelle, seules les bactéries *Listeria spp.* et *Stenotrophomonas spp.* ont été isolées. Ceci explique une très faible diversité bactérienne au cours de l'hiver 2008.

Le groupe 2 est composé de sept objets spatio-temporels. La dimension temporelle est composée de : Automne 2008, Hiver 2009, Hiver 2010 et Printemps 2010. La dimension spatiale comporte les sites : Doucene (Biskra), Sidi Okba (Biskra) et Ferdoua (Mila).

Ce groupe spatio-temporel représente une plus forte densité bactérienne (10 individus bactériens) comparativement au groupe 1. Les bactéries isolées sont : *Enterococcus spp*, *Staphylococcus spp.*, *Acinetobacterspp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Listeria spp.*, *Bacillus spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Flavobacterium spp.* et *Yersinia spp.*

Seuls les germes *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.* et *Alcaligenes spp.* ne sont pas représentés dans cette dimension spatio-temporelle.

Le groupe 3 spatio-temporel est caractérisé pas la dimension temporelle constituée des saisons suivantes : Printemps 2008, Printemps 2009 et été 2009. Les régions de la dimension spatiale de ce groupe sont Grarem (Mila) et Siliana (Mila).

C'est un groupe plus homogène du point de vue géographique du fait que nous avons noté l'absence des sites relatifs à la Wilaya de Biskra. Les trois saisons (Printemps 2008, Printemps 2009 et été 2009) observées à Mila sont caractérisée par une forte densité bactérienne alors qu'à Biskra, aucun germe n'y a été isolé.

L'ensemble des bactéries isolées en fonction des dimensions spatio-temporelles constitutives du groupe 3 est : *Enterococcus spp*, *Proteus spp*, *Staphylococcus spp*, *Aeromonas spp*, *Listeria spp* et *Stenotrophomonas spp.* soit un total de sept germes différents.

Le groupe 4 est représenté par les dimensions Automne 2009 et El-Hadjeb (Biskra). Ce groupe est constitué par : *Enterococcus spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp* et *Alcaligenes spp*.

Les distances par rapport aux différents centres de gravité entre les quatre groupes spatio-temporels (Tableau 27) révèlent une forte similarité entre les groupes 3 et 4 dans lesquels ont été isolés en communs *Enterococcus spp* et *Proteus spp*. Cependant, nous observons un fort éloignement entre les composantes spatio-temporelles du groupe 2 et celles du groupe 4 entre les quels une distance de 1,756 a été mesurée. En effet, les dimensions saison et sites géographiques ne sont pas identiques au sein de ces deux groupes en plus de la nature bactérienne très diversifiée dans le groupe 2 (10 individus) comparativement au groupe 4 où nous avons noté quatre individus (*Enterococcus spp*, *Proteus spp*, *Klebsiella spp* et *Alcaligenes spp*).

Tableau 27 : Distances entre les barycentres des différents groupes spatio-temporels

	1	2	3	4
1	0			
2	1,424	0		
3	1,631	1,312	0	
4	1,753	1,756	1,233	0

L'ACP a fournit une matrice des corrélations, calculée selon le coefficient de Pearson, entre l'ensemble des bactéries isolées dans les deux régions (Tableau 28) :

Tableau 28 : Matrice des corrélations (Pearson (n)).

	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Stph</i>	<i>Acin</i>	<i>Prot</i>	<i>Aero</i>	<i>Psdo</i>	<i>Klbs</i>	<i>Yers</i>	<i>Baci</i>	<i>Flav</i>	<i>Alca</i>	<i>Sten</i>
<i>Entr</i>	1												
<i>List</i>	-0,468	1											
<i>Stph</i>	0,068	0,218	1										
<i>Acin</i>	-0,272	0,491	0,444	1									
<i>Prot</i>	0,000	-0,189	-0,289	-0,289	1								
<i>Aero</i>	0,612	0,055	0,389	0,111	-0,289	1							
<i>Psdo</i>	0,000	0,378	0,289	0,866	-0,500	0,289	1						
<i>Klbs</i>	-0,167	-0,200	-0,068	-0,068	0,354	-0,612	-0,354	1					
<i>Yers</i>	0,196	0,367	0,080	0,480	-0,277	0,320	0,555	-0,196	1				
<i>Baci</i>	0,302	0,564	0,431	0,431	-0,426	0,492	0,533	-0,302	0,650	1			
<i>Flav</i>	0,196	0,367	0,080	0,480	-0,277	0,320	0,555	-0,196	1,000	0,650	1		
<i>Alca</i>	0,196	-0,419	-0,320	-0,320	0,139	-0,480	-0,277	0,784	-0,154	-0,237	-0,154	1	
<i>Sten</i>	-0,075	0,564	0,123	-0,185	-0,107	0,185	-0,107	-0,302	-0,237	0,318	-0,237	-0,237	1
	<i>Entr</i>	<i>List</i>	<i>Stph</i>	<i>Acin</i>	<i>Prot</i>	<i>Aero</i>	<i>Psdo</i>	<i>Klbs</i>	<i>Yers</i>	<i>Baci</i>	<i>Flav</i>	<i>Alca</i>	<i>Sten</i>

Entr : Enterococcus, *List* : Listeria, *Stph* :Staphylococcus, *Acin* : Acinetobacter, *Prot* : Proteus, *Aero* : Aeromonas, *Psdo* : Pseudomonas, *Klbs* : Klebsiella, *Yers* : Yersinia, *Baci* : Bacillus, *Flav* : Flavobacterium, *Alca* : Alcaligenes, *Sten* : Stenotrophomonas.

Une parfaite corrélation ($r = 1$) est observée entre *Flavobacterium spp* et *Yersinia spp*. suivie d'une autre corrélation positive entre *Listeria spp.* et *Bacillus spp* ($r = 0,564$). Cette dernière est significative comparée à celle de la table de Pearson ($n = 13$ bactéries) où la valeur critique est $r = 0,553$ au risque α de 5 %.

Pour le cas de la paire *Flavobacterium spp* et *Yersinia spp*. nous avons observé une distribution spatio-temporelle parfaitement identique. Ils sont en effet présents tous les deux au printemps 2010 à Sidi Okba (Biskra).

Concernant le couple *Listeria spp.* et *Bacillus spp.*, ils ont été isolés en même temps pendant les hivers 2009 et 2010 et pendant le printemps 2010. Leur distribution géographique commune est observée à Biskra (Doucene et Sidi Okba). Cependant, seule *Listeria spp.* a été isolée aux hivers 2008 et 2009. La différence dans la distribution spatiale a lieu à Mila où *Bacillus spp.* n'a pas été isolé Grarem et à Ferdoua, contrairement à *Listeria spp.*

Les deux axes (Tableau 29) donnent une information égale à 53,231 % de la représentation du nuage de points formé par l'ensemble des éléments spatio-temporels.

Tableau 29 : Valeur propre et variation (%) exprimées par les composantes principales

	Axe 1 : Composante principale 1	Axe 2 Composante principale 2
Valeur propre	4,792	2,128
Variabilité (%)	36,861	16,370
% cumulé	36,861	53,231

La contribution des bactéries dans la construction des deux composantes principales est le résultat de leurs corrélations avec ces axes.

Selon le tableau 30, nous constatons une forte corrélation entre *Bacillus spp.* et l'axe 1

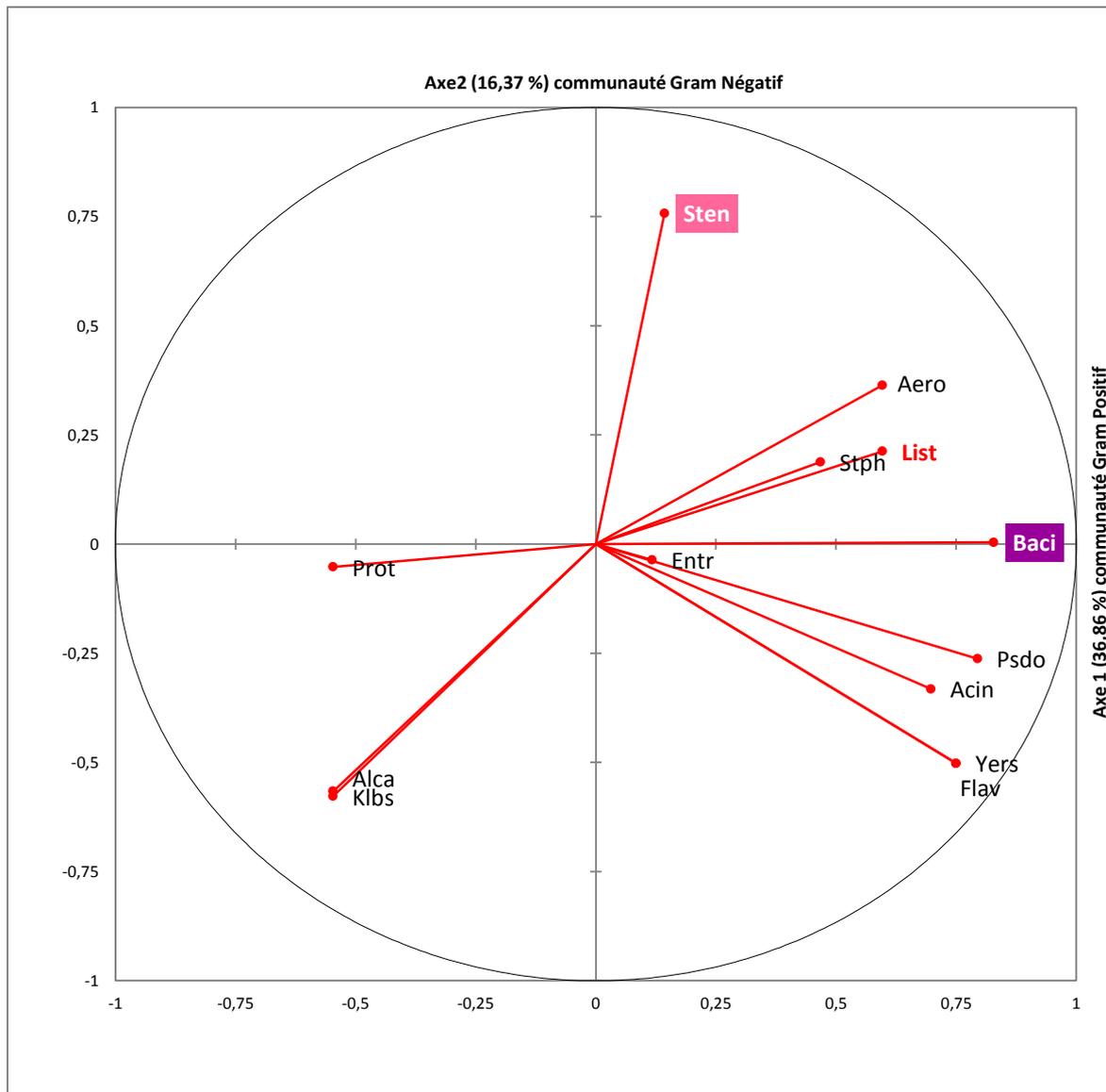
(horizontal), d'une part et entre *Stenotrophomonas spp.* et l'axe 2 (vertical) d'autre part.

Tableau 30 : Corrélation des souches avec les axes 1 et 2

	F1	F2
<i>Enterococcus</i>	0,117	-0,036
<i>Listeria</i>	0,597	0,212
<i>Staphylococcus</i>	0,468	0,188
<i>Acinetobacter</i>	0,697	-0,332
<i>Proteus</i>	-0,547	-0,052
<i>Aeromonas</i>	0,597	0,364
<i>Pseudomonas</i>	0,795	-0,263
<i>Klebsiella</i>	-0,547	-0,578
<i>Yersinia</i>	0,750	-0,502
<i>Bacillus</i>	0,828	0,004
<i>Flavobacterium</i>	0,750	-0,502
<i>Alcaligenes</i>	-0,547	-0,566
<i>Stenotrophomonas</i>	0,143	0,757

Le cercle des corrélations (Graphique 5) montre les individus bactériens qui contribuent le plus dans la formation des deux composantes 1 et 2.

En effet, nous constatons une forte corrélation de *Bacillus spp.* avec l'axe 1 et de *Stenotrophomonas spp.* avec l'axe 2. Cela permet de donner le sens de "communauté bactérienne à Gram positif" pour l'axe 1. L'axe 2, fortement corrélé à *Stenotrophomonas spp.* prend le sens de "communauté bactérienne à Gram négatif".



Graphique 5 : Cercle des corrélations inter bactériennes.

Entr : Enterococcus, *List* : Listeria, *Stph* :Staphylococcus, *Acin* : Acinetobacter, *Prot* : Proteus, *Aero* : Aeromonas, *Psdo* : Pseudomonas, *Klbs* : Klebsiella, *Yers* : Yersinia, *Baci* : Bacillus, *Flav* : Flavobacterium, *Alca* : Alcaligenes, *Sten* : Stenotrophomonas.

L'analyse du graphique des individus spatio-temporels (Graphique 6) permet de retirer six groupes spatio-temporels différents formés par des associations bidimensionnelles de type *Espace – Temps*..

Le groupe 1 constitué de l'association "*Sidi-Okba / Printemps 2010* " est lié à la première composante principale représentée par les bactéries à Gram Positif. En effet, la quasi-totalité des genres à Gram positif ont été isolés dans cet élément spatio-temporel. Les bactéries Gram Positif isolées sont : *Enterococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Yersinia spp.* et *Bacillus spp.*

Staphylococcus spp. (un Gram positif) est le seul à ne pas être isolé dans cet élément spatio-temporel.

Le groupe 2 est une association spatio-temporelle de type "*Doucen / Hiver 2010* " dans laquelle ont été isolés : *Enterococcus*, *Listeria*, *Aeromonas* et *Stenotrophomonas*.

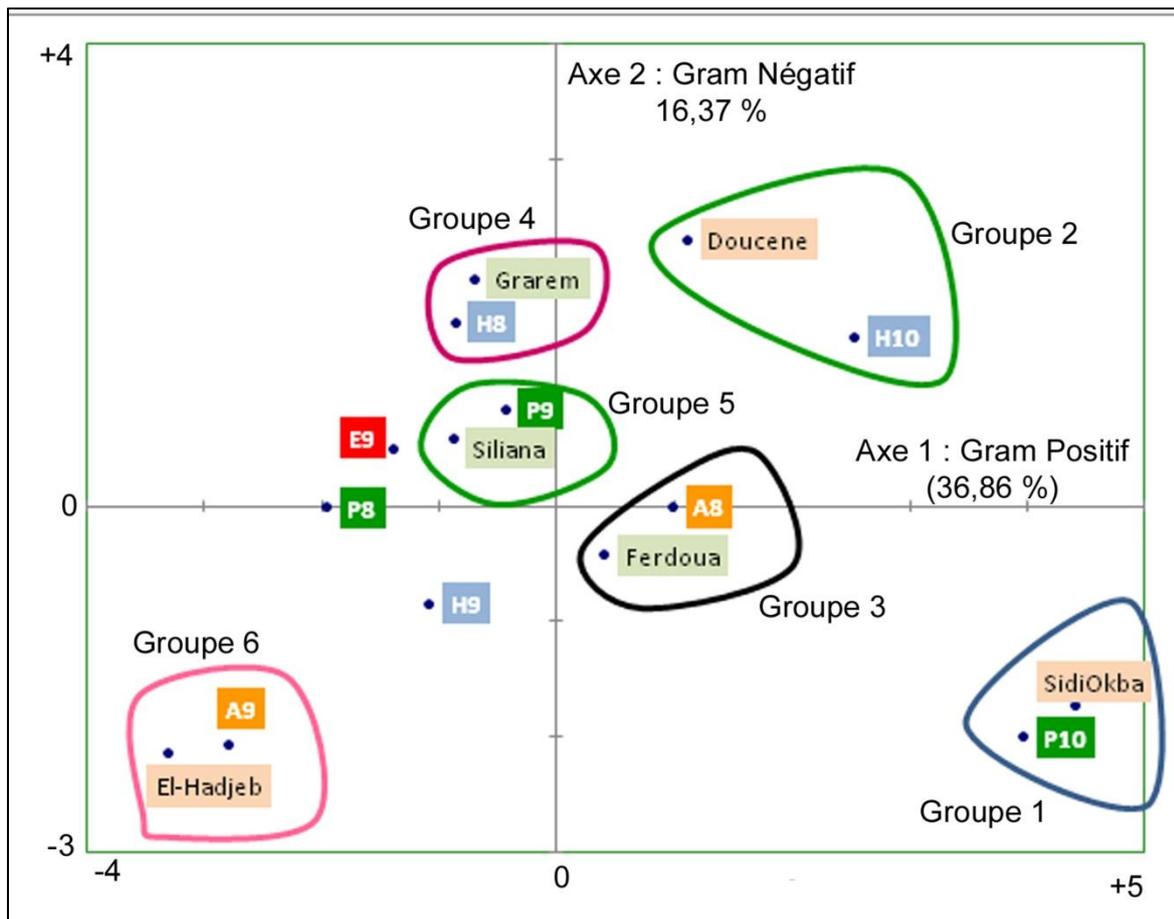
Le groupe 3 représente l'association "*Ferdoua / Automne 2008* " et est plus corrélé à la composante principale 2 qui représente les bactéries à Gram Négatifs. Dans cet élément spatio-temporel, nous n'avons isolé que *Pseudomonas spp.* une bactérie à Gram négatif qui conforte son appartenance à cet élément spatio-temporel.

Le groupe 4 représente l'association "*Grarem / Hiver 2008* " dans laquelle nous avons isolé *Listeria spp* et *Stenotrophomonas spp.*

Le groupe 5 est un élément spatio-temporel défini par l'association "*Siliana / Printemps 2009* " et caractérisé par les isollements de *Enterococcus spp.* et de *Aeromonas spp.*

Le groupe 6 comprend les bactéries *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.* et *Alcaligenes spp.* Il est représenté par les dimensions spatio-temporelles du type "*El Hadjeb / Automne 2009* ".

Il est à retenir que les éléments temporels définis par le printemps 2008, l'Hiver 2009 et l'été 2009 n'ont exprimé aucune association spatiale avec Biskra et Mila. Néanmoins, toutes les localités géographiques sont représentées dans les différentes associations spatio-temporelles.



Graphique6 : Distribution des groupes spatio-temporels par rapport aux types de Gram (positif et négatif).

L'ensemble des associations spatio-temporelles peut être regroupé dans le tableau suivant :

Tableau 31 : Distributions bactériennes spatio-temporelles

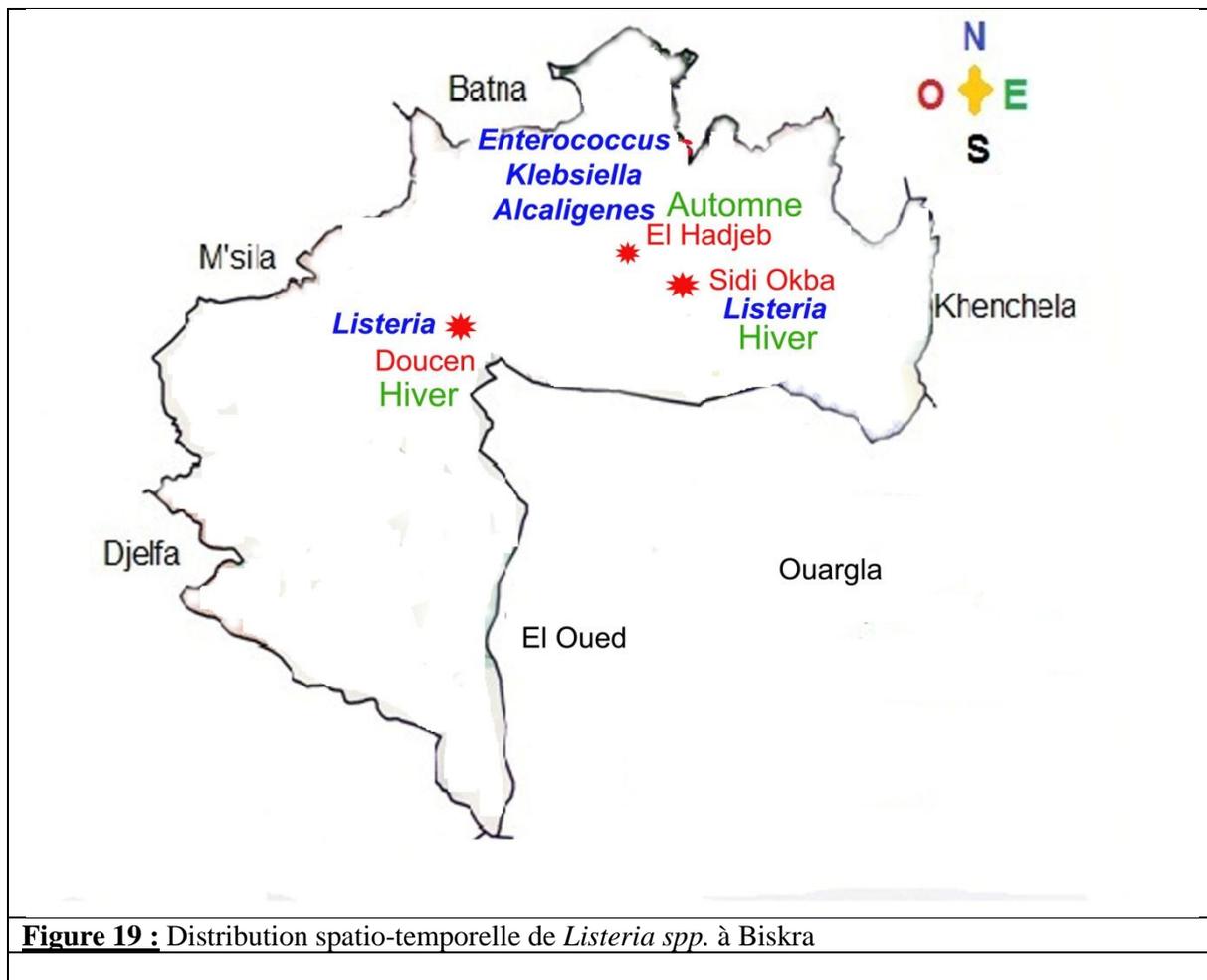
Groupes	Associations spatio-temporelles	Bactéries	n
1	<i>Sidi-Okba / Printemps 2010</i>	<i>Enterococcus spp., Listeria spp., Acinetobacter spp., Flavobacterium spp., Aeromonas spp., Pseudomonas spp., Yersinia spp. et Bacillus spp.</i>	8
2	<i>Doucene / Hiver 2010</i>	<i>Enterococcus spp., Listeria spp., Aeromonas spp. et Stenotrophomonas spp.</i>	4
3	<i>Ferdoua / Automne 2008</i>	<i>Pseudomonas spp</i>	1
4	<i>Grarem / Hiver 2008</i>	<i>Listeria spp et Stenotrophomonas spp.</i>	2
5	<i>Siliana / Printemps 2009</i>	<i>Enterococcus spp. et Aeromonas spp.</i>	2
6	<i>El Hadjeb / Automne 2009</i>	<i>Enterococcus spp., Klebsiella spp. et Alcaligenes spp.</i>	3

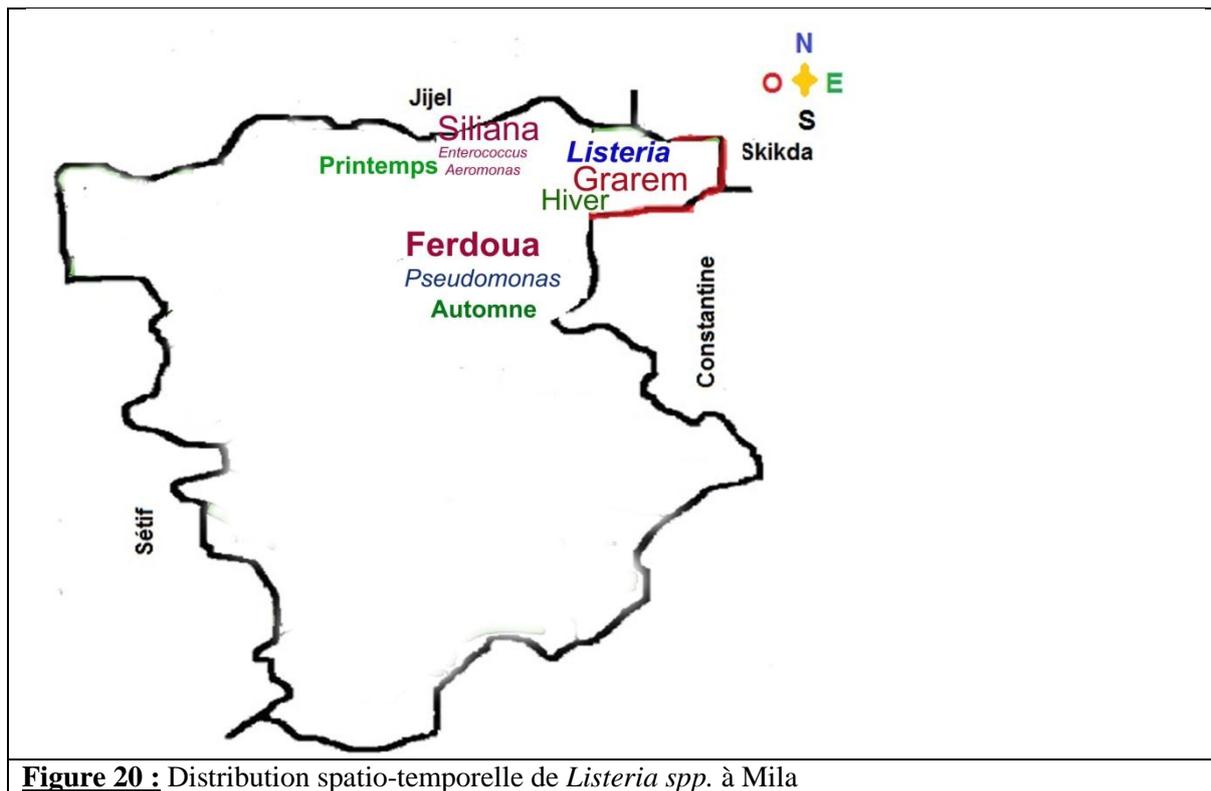
Il découle que les bactéries non retrouvées à Biskra sont au nombre de deux : *Staphylococcus spp.* et *Proteus spp.*. Cependant, à Mila, huit bactéries sont absentes lors des isollements. Il s'agit de : *Staphylococcus spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Yersinia spp.*, *Bacillus spp.*, *Flavobacterium spp.* et *Alcaligenes spp.*

En comparant les isolats des deux régions, nous constatons que *Staphylococcus spp.* et *Proteus spp.* sont les seules bactéries à ne pas posséder d'entité spatio-temporelle. Leur présence est donc aléatoire et ne dépend pas de l'interaction spatio-temporelle contrairement au reste des bactéries isolées.

Listeria spp. a montré deux entités spatio-temporelles. La première est du type *Sidi-Okba / Printemps 2010* et la seconde du type *Doucen / Hiver 2010*.

Nous pouvons donc faire le constat que *Listeria spp.* est plus présente en région de Biskra comparativement à Mila et en Hiver plutôt que dans les autres saisons (figures 19 et 20)





En fin, l'ensemble de nos constatations fait ressortir une variation évidente dans la distribution spatio-temporelle des bactéries, en particulier *Listeria spp.* qui exprime plus d'affinité (semble t-il) aux coordonnées hivernales Sud plutôt que le Nord dans le reste des saisons. Ces affinités spatio-temporelles, si elles ne sont pas aléatoires, elles seraient liées principalement à :

- Une forte présence (voire fréquente) d'excréments sur les téguments de l'animal et le sol ; ce qui constitue un indice d'une mauvaise hygiène (voir Annexe A) et un risque très élevé de contamination bactériologique,
- Mise à part la saison du printemps, les vaches sont nourries essentiellement d'ensilage et de suppléments nutritifs. Or l'ensilage constitue, à lui seul, une source bien évidente de contamination, surtout par *L. monocytogenes*. Larpent (2000) estime une durée de vie entre 180 et 2190 jours des *Listeria* dans l'ensilage lorsque la température est voisine de 5°C. Il ajoute que ces bactéries présentent la même estimation de survie dans les fèces des ruminants à la même température. De plus, il note que la fréquence de contamination par des *Listeria spp.* est de l'ordre de 3,6 % pour l'ensilage de maïs et de 2,5 à 5,9 % pour l'ensilage d'herbe avec une incidence fortement accrue (44 %) sur des échantillons moisiss.
- Conditions d'hygiène de travail : absence de revêtement des sols et des murs au moins par du ciment, surtout à Biskra,
- Qualité du personnel : Dans toutes les fermes visitées, une seule (Ferdoua : Mila), dispose d'un ingénieur d'Etat agronome, alors que dans les autres fermes nous avons noté un personnel non formé voire non qualifié, plutôt traditionnel.
- Le matériel de traite est juste rincé à l'eau sans traitement particulier de désinfection la plupart du temps,

Nos résultats concernant la distribution spatio-temporelle bactérienne, particulièrement de *L. monocytogenes*, sont corroborés par plusieurs études similaires à la notre réalisées sur des environnements et des saisons aussi variables que les nôtres. Ainsi, Chambelle *et al.* (2007), en travaillant sur huit fermes de deux régions différentes et éloignées du Portugal (L'archipel océanique de l'Azores en atlantique du Nord et la région Sud) ont isolé 213 souches de *L. monocytogenes* afin d'en évaluer la présence et la distribution par rapport à l'environnement. Ils ont noté que l'occurrence de *L. monocytogenes* était plus importante dans la région Sud du Portugal : une différence significative entre les deux régions ($p < 0,001$) avec 27 cas sur 49 en Azores (Nord) contre 94 cas sur 164 au Sud. Cependant, dans la seule région du Nord (en Azores), *L. innocua* était la plus isolée par rapport à *L. seeligeri* et *L. ivanovii*. La présence des *Listeria spp.* était liée à des risques de contamination liés aux fermes elles-mêmes : environnement de production laitière et l'état du matériel utilisé. Les mêmes auteurs ajoutent qu'au Sud du Portugal, les fermes sont de type artisanal et manquent de moyens technologiques, d'hygiène et de sécurité comparativement au Nord où les fermes sont plutôt semi-industrielles et bénéficient d'une meilleure expérience professionnelle en termes de gestion des risques microbiologiques vue la qualité du personnel travailleur qui a bénéficié de formations et de stages de recyclages dans le cadre de l'évaluation et la gestion des risques.

Farber *et al.* (1988), en travaillant sur 445 échantillons de laits de vaches récoltés dans plusieurs régions différentes de l'Ontario (Canada), retrouve des *Listeria spp.* dans 55 cas (soit 12,4 %) :

<i>L. innocua</i> :	43/445	(9,7 %)
<i>L. monocytogenes</i> :	6/445	(1,3 %)
<i>L. welshimeri</i> :	6/445	(1,3 %)

L'incidence des *Listeria spp.* était plus faible dans les régions Ouest, Nord et Sud comparativement à la région Est de l'Ontario. D'autre part, il note une faible incidence en Hiver par rapport au reste des saisons.

Yoshida *et al.* (1998), ont analysé le lait de 943 fermes à la préfecture de Nagano (Japon) durant la période allant de décembre 1990 à avril 1991. Ils ont retrouvé 29 cas de présence (soit 3,1 %) des *Listeria spp.* spatialement répartis ainsi :

Sud : 22/362 (6,1 %)

Centre : 4/272 (1,5 %)

Est : 2/143 (1,4 %)

Nord : 1/166 (0,6 %)

L. monocytogenes est retrouvée dans 0,3 % des cas au Sud de la préfecture de Nagano avec les sérotypes : 4b et 1/2a.

De plus, cette fois-ci entre février 1991 et janvier 1992, ils ont analysé 504 échantillons provenant de 65 fermes du Sud où ils ont noté une forte prévalence des *Listeria spp.* associée à une variation saisonnière. Elle est plus importante au printemps (14,3 %) par rapport à l'automne (4,8 %). Le sérotype dominant étant 4b.

La distribution spatio-temporelle étalée sur une période de trois ans, a également été étudiée en Illinois (USA) par ribotypage (Eco RI et PvuII) sur 72 isolats de *L. monocytogenes* (Gendel et Ulaszek, 2000). Une distribution spatiale et temporelle homogène dans tout l'Illinois a été observée pour tous les ribotypes. Une constatation

identique a été observée dans les travaux de Greenwood *et al.* (1991) qui ont noté une

distribution homogène spatio-temporelle des sérotypes 1/2a et 4b dans 769 échantillons analysés.

En Corée (Baek *et al.*, 2000), 1573 échantillons de produits laitiers (dont 122 de laits crus de vaches) ont été examinés pour mesurer l'incidence spatio-temporelle de *L. monocytogenes* entre 1993 et 1997. Sur l'ensemble des échantillons de lait cru, *L. monocytogenes* a été retrouvée dans 7,9 % des cas avec une prédominance du sérotype 1/2b qui a exprimé une nette spécificité géographique.

Conclusion et recommandations

Listeria monocytogenes est une bactérie pathogène qui peut aisément être isolé à partir du lait cru. Elle est à l'origine de nombreuses contaminations observées régulièrement dans les produits à base de lait cru. Les *Listeria spp.*, par leur présence dans le lait cru et leur caractère ubiquitaire, surtout leur capacité à se développer aux basses températures, vont représenter un danger réel pour le consommateur. Il devient donc nécessaire d'élaborer des orientations pour la gestion de risques associés à sa présence dans le lait de vaches.

Afin de mettre en évidence le risque *Listeria* à travers ce travail, nous sommes passés par une meilleure connaissance des relations espace-temps en effectuant des analyses factorielles et phylogénétiques. Il ressort alors que les bactéries retrouvées dans les laits analysés au cours de nos travaux, appartiennent à 13 genres différents isolées à la fois dans les différentes saisons de l'année et dans les deux régions concernées par nos investigations à savoir Biskra et Mila. Tous ces genres sont résistants à la Cefazoline et ayant poussé dans les mêmes conditions de culture que *Listeria spp.*

Enterococcus spp. est de loin la bactérie la plus répandue dans les 104 échantillons analysés, avec une incidence de 19,23 % (soit 20 échantillons sur 104 analysés). Cependant, *Flavobacterium spp.* et *Alcaligenes spp.* sont les moins retrouvés, avec un taux d'isolement inférieur à 1 %.

Six échantillons de lait sont contaminés par *Listeria spp.* ; soit un taux d'isolement de 5,77 %. Celui-ci est comparable à ceux cités par la littérature dans d'autres pays : Les études ont montré différents niveaux de contamination par *L. monocytogenes* dans le lait cru : 0 % en Italie et en Suisse, 1 % en Suède, 7 % aux Etats Unis d'Amérique, 12 % au Canada, 13% au Brésil et 2 % en Corée (Ha *et al*, 2002 ; Jemmi et Stephan 2006). L'incidence de *Listeria spp.* est de 2,2 % en Iran (Moshtaghi et Mohamadpour 2007) et de 6 % en Turquie (Vardar-Ünlü *et al*, 1998).

L'incidence de *Listeria spp.* est saisonnière. Elle est plus importante les mois d'hiver (16,13 %) par rapport aux autres saisons (Printemps : 3,33 %, Eté : 0% et Automne 0 %). Paradoxalement, l'incidence de *Listeria spp.* (4,41%) est plus faible dans la région de Biskra que dans la région de Mila (8,33%). Les conditions hygiéniques étant meilleures à Mila.

Les analyses biomoléculaires et bioinformatique des séquences nucléiques 16S a été réalisée pour le cas de 10 souches.

Une forte identité moléculaire a été observée entre toutes les séquences 16S des souches *Enterococcus spp.* (Quatre de Mila et une de Biskra). *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016 et *Stenotrophomonas maltophilia* forment un groupe phylogénétique plus proche des *Enterococcus spp.* Le clade formé par *Aeromonas veronii* et *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 est étroitement lié à la souche de *Bacillus mojavensis* strain IFO15718.

Les analyses spatio-temporelles ont révélé une forte similarité entre les différents groupes isolés. En effet, plusieurs associations du type *germes/espace/saison* ont été relevées : *Enterococcus spp.* est associé avec Siliana (Mila) et aux deux saisons Printemps et été. Cependant, *Listeria spp.* avec *Acinetobacter spp.* et *Pseudomonas spp* montrent une association avec les dimension spatio-temporelles Ferdoua-Hiver.

La CHA a révélé l'existence de trois groupes bactériens. *Listeria spp.* fait partie du groupe 1 constitué de neuf individus. Elle n'a pas exprimé donc un comportement spatio-temporel isolé. Cependant, l'ACP a permis de mesurer une corrélation significative ($r = 0,564$) de *Listeria spp.* avec *Bacillus spp.* qui, lui aussi, fait partie du groupe 1 de la CHA et retrouvé dans 3,85 % des laits analysés. Cette forte corrélation serait due à leur présence commune dans la Wilaya de Biskra avec les taux respectifs de 4,41 % et 3,84 %.

L'évaluation quantitative des risques microbiologiques à *Listeria spp.* dans le lait cru est donc destinée à répondre à des questions spécifiques importantes pour la santé publique.

La Consultation de nos résultats a conclu que le travail réalisé doit être considéré comme une activité pour démontrer:

- l'applicabilité et l'utilité de la méthodologie d'isolement des *Listeria* à base de Cefazoline;
- la nécessité de disposer de données après enquêtes et études expérimentales pour fournir des informations sur l'évaluation du risque *Listeria* ;
- la nécessité de connaître et de comprendre davantage les distributions spatio-temporelles et leurs probabilités pour décrire les variables qui peuvent avoir une influence majeure sur les prédictions de risque *Listeria* ;

RECOMMANDATIONS :

La Consultation des résultats a fait siennes les recommandations formulées par la conclusion générale de ce travail.

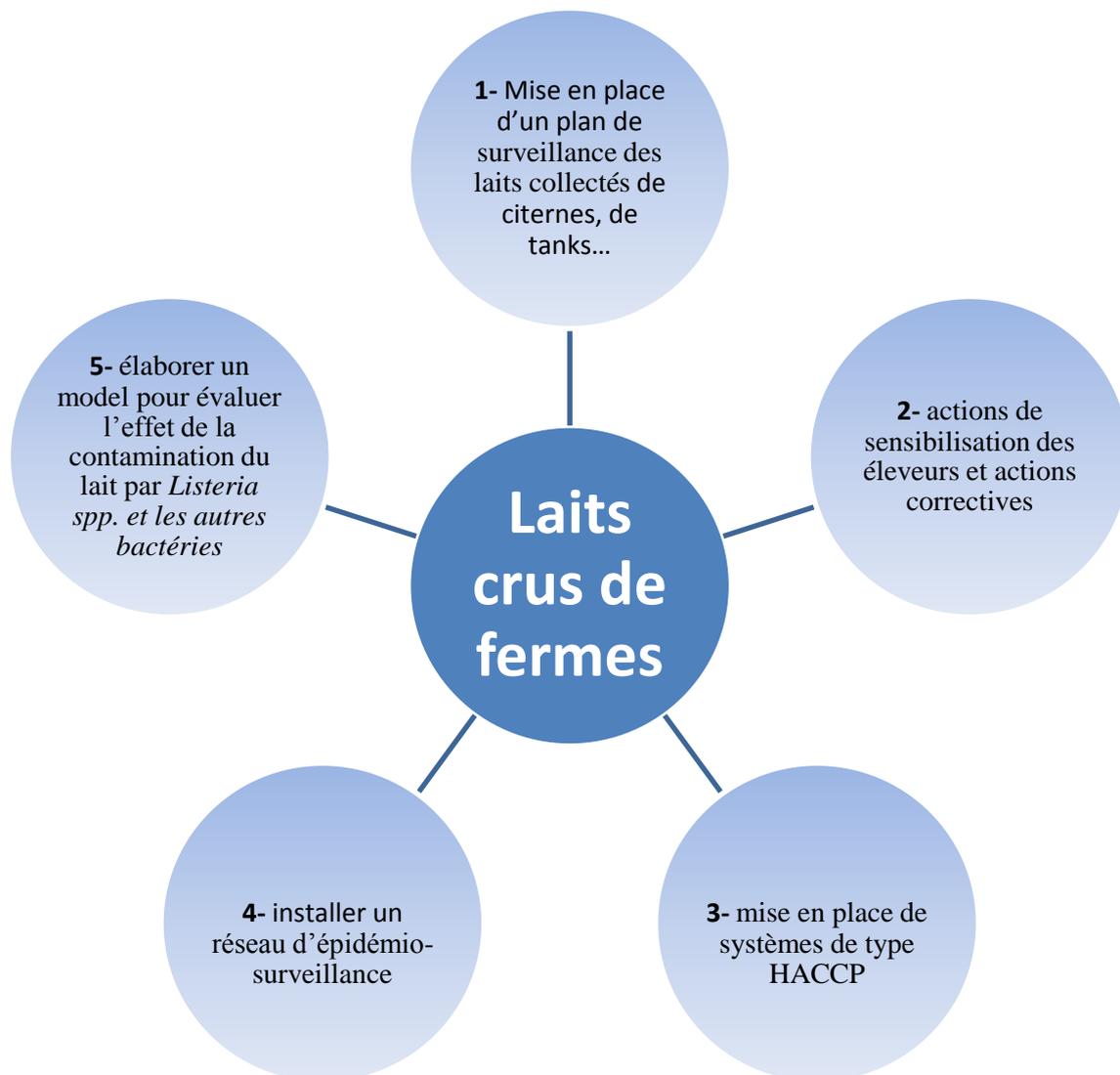
En outre nous recommandons

- La notion de gestion du risque *Listeria* doit impérativement être définie de manière claire afin de garantir que l'évaluation est correctement ciblée, et l'interaction est indispensable à cet égard.
- améliorer la collecte et la génération des données spatio-temporelles nécessaires pour l'évaluation du risque *Listeria*,
- proposer ou élaborer un formulaire pour demander l'avis de la Consultation d'experts vétérinaires et microbiologistes en matière d'évaluation du risque *Listeria*.
- Les recherches à venir doivent être effectuées dans un but de prendre en compte le rôle de l'influence du climat et des saisons dans les différentes régions de l'Algérie qui n'ont pu être analysées dans nos travaux.

En fin, la connaissance de la qualité bactériologique du lait cru (spécialement la flore psychrotrophe dont *Listeria spp.*) est un travail qui vise la sécurité alimentaire et la santé de l'animal. **La sécurité alimentaire** passe par l'analyse bactériologique en particulier la recherche de pathogènes de type *Listeria spp.* **La santé de l'animal** doit être traduite par des bonnes pratiques d'élevage : hygiène, alimentation, traite, contrôle vétérinaire. En effet, l'alimentation, surtout l'ensilage, joue un rôle important dans la contamination du lait par les *Listeria*. Il faut donc appliquer des moyens de lutte pour les meilleures habitudes pratiques durant la traite et même durant toute la période d'élevage. Il est temps de penser à installer des méthodes d'analyse et de gestion des risques biologiques (de HACCP à ISO 22000) pour le management de la sécurité des aliments, pour mieux maîtriser les points faible de la chaîne

de transport du lait depuis la ferme jusqu'au consommateur afin de lutter contre les germes indésirables du type *Listeria*.

Actuellement, il n'existe pas de modèle adapté au comportement de *Listeria* aux basses températures. En effet, *Listeria* adopte à ces températures un comportement atypique par rapport à la plupart des micro-organismes d'où la nécessité d'adopter une modélisation statistique construite sur la base des facteurs spatio-temporelles avec un scénario mis en place pour la gestion du risque *Listeria* comme le montre notre organigramme :



BIBLIOGRAPHIE

- Achemchem F., Abrini J., Martinez-Bueno M., Valida E., Maqueda M. (2004). Purification et caractérisation d'une bactériocine anti-*Listeria* produite par *Enterococcus faecium* F-420 isolé à partir de lait cru de chèvre. *Congrès International de Biochimie*, Marrakech. p. 384-388.
- Achenbach L. A., Carey J., Madigan M. T. (2001). Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Appl. Env. Microbiol.* **7**: 2922-6.
- AFSSA (2000). Rapport de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. 146 p.
- Allerberger F., Wagner M. (2010). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**, 16-23.
- Amann R.I., Ludwig W., Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-69.
- Anonyme (2003). *Bactériologie*. DCEM1. Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. 122 p.
- Aurya K., Le Bouquinb S., Toquina M. T., Huneau-Salatünb A., Le Nôtre Y., Allain V., *et al.* (2011). Risk factors for *Listeria monocytogenes* contamination in French laying hens and broiler flocks. *Preventive Veterinary Medicine.* **98** : 271-278.
- Baek SY, Lim SY, Lee DH, Min KH, Kim CM. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. *J Food Prot.***63**(2):186-189.
- Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T., Charbit A., *et al.* (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science.* **294** : 849-852.
- Bellouni R. (1990). *Listeria monocytogenes* : bactériologie et épidémiologie. Thèse Doctorat en sciences médicales, INESM, Université d'Alger (USTHB). 165 p.
- Ben Embarek P.K. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: A review. *Int. J. Food Microbiol.***23**: 17-34.
- Berche P. (1999). Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. Infection néonatales II .Vol 2. p.33-39.
- Berche P., Kayal S., Nassif X., Poyart C. (2002). Bactériologie systématique. D.C.E.M.1. Faculté de Médecine Necker-Enfants malades. 94 p.
- Bind J. L. (1990). Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en industries agro-alimentaire. *In* "analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des microorganismes dans les I.A.A.". Compte-rendu des conférences prononcées à l'occasion du séminaire CPCIA d'octobre 1990. Paris, APRIA. p. 55-76.

- Bornert G. (2000). Importance des bactéries psychrotrophes en hygiène des denrées alimentaires, *Revue Méd. Vét.*, **151**(11) : 1003-1010.
- Boubendir A., Hamidechi M.A., Mostakim M., El Abed S., Ibsouda Koraichi S. (2011). Incidence de *Listeria* spp. et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord Est Algérien. *Revue Méd. Vét.* **162**. (5) :265-269.
- Bourne D. G., McDonald I. R., Murrell J. C. (2001). Comparison of pmoA PCR primer sets as tools for investigating methanotroph diversity in three Danish soils. *Appl. Env. Microbiol.* **9** : 3802-3809.
- Brett, M.S.Y., Short, P. and McLauchlin, P. (1998). A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* **43**(3): 223-229.
- Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., de Buyser M.L., Collette C., Garin-Bastuji B. *et al.* (1990). Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers : Situation en France et en Europe. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **16** : 452-471.
- S.M., Diot A., Bastian S., Riviere J., Cerf O. (2003). Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* **80**:1-15.
- Bubert A., Heinl, Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M. (1999). Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4688-4892.
- Cabanes D., Dussurget O., Dehoux P., Cossart P. (2004). Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Mol. Microbiol.* **51** (16) : 1601-1614.
- Chakraborty T., Hain T., Domann E. (2000). Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:167-174.
- Chan Y.C., Boor K.J., Wiedmann M. (2007). σ^B -dependent and σ^B -independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. *Appl. Environmental Microbiol.* **73** : 6019-6029.
- Chang Y. J., Peacock A. D., Long P. E., Stephen J. R., McKinley J. P., Macnaughton, S. J. *et al.* (2001). Diversity and characterization of sulfate-reducing bacteria in groundwater at a uranium mill tailings site. *Appl. Env Microbiol.* **7** : 3149-60.
- Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G. (2002). Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by Molecular Methods. *Appl. and Environ. Microbiol.* **68** :6273-6282.
- Cossart P., Archamboud C. (2009). The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* : An emerging model in prokaryotic transcriptomics. *J. Biol.* **202** : 8-107.

- Crerar S. K., Castle M., Hassel S., Schumacher D. (2011). Recent Experiences with *Listeria monocytogenes* in New Zealand and development of a food control risk-based strategy. *Food Contrôle*. **22** : 1510-1512.
- Croce O. (2005). Conception de puces à ADN pour l'identification d'organismes. Thèse de Doctorat en Sciences. Université de Nice-Sophia Antipolis -UFR Sciences. Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé. 144p.
- Darlu P., Tassy P., (2004). *La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes*. Masson. Paris. ISBN : 2-225- 84229-9. 241 p.
- Dillon, R.M., Patel, T.R. and Ratman, S. (1994). Occurrence of *Listeria* in hot and cold-smoked seafood products. *Int. J. Food Microbiol.* **22**: 73-77.
- D.P.A.T. (2005). La wilaya de Biskra en quelques chiffres. Direction de la planification et de l'aménagement du territoire. 145 p.
- Dramsi S., Dehoux P., Lebrun M., Goossens P.L., Cossart P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD, *Infect. Immun.* **65** : 1615-1625.
- Edwards A. W. F. and Cavalli-Sforz L. L. (1964). Phenetic and Phylogenetic Classification. Chapter Reconstruction of evolutionary trees. *System. Association Publ.* **6** : 67-76.
- Elmnasser N., Ritz-Bricaud M., Guillou S., Leroi F., Orange N., Bakhrouf A., Federighi M. (2006). Réponse adaptative de *Listeriamonocytogenes* au stress osmotique et froid: Implication en sécurité des aliments. *Revue Méd. Vét.* **157** (2) : 92-101.
- Elotmani F., Revol-Junelles A.M., Assobhei O., Milliere J.B. (2002). Characterization of Anti-*Listeriamonocytogenes* Bacteriocins from *Enterococcusfaecalis*, *Enterococcusfaecium* and *Lactococcuslactis* Strains isolated from Raib, a Moroccan Traditional Fermented Milk. *Cur. Microbiol.***44**:10-17.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E. and Pelroy, G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Protection***58**: 502-508.
- Espaze E. P., Rocourt J., Courtieu A. L. (1991). La listériose en France en 1988. Etude à partir de souches adressées au Centre National de Référence. *Bull. Epidémiol. Hebd.* **3**, p. 9-10
- Euzéby J.P. (2000). *Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire*. Disponible à l'URL <<http://www.bacdico.net>>
- Euzéby J.P. (2010). *Dictionnaire de Bactériologie vétérinaire*. Disponible à l'URL <<http://www.bacdico.net>>
- Farber J.M., Sanders G.W., Malcolm S.A. (1988). The presence of *Listeria spp.* in raw milk in Ontario. *Can. J. Microbiol.* **34**: 95-100.

- Farber J.M., Peterkin P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**:476
- Felsenste J. (1973). Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22**: 240-249.
- Felsenstein J. (1993). PHYLIP (**Phy**logeny **I**nference **P**ackage) Version 3.5c. Distributed by the Author, Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Filee J. (2002). Phylogénie moléculaire des gènes viraux impliqués dans le métabolisme et la réplication de l'ADN. Thèse de Doctorat en Sciences. Université Paris-Sud Centre d'Orsay. 131 p.
- Fosse J. Magras C. (2004). Dangers biologiques et consommation des viandes. Editions, Tec et Doc. p.133-141.
- Garrity G. M., Liburn T. G., Cole J. R., Harrison S. H., Euséby J. and Tindall B. J. (2007). Taxonomic outline of the bacteria and archaea. Part 9 - The bacteria: Phylum "Firmicutes":Class."Bacilli". p. 333- 398.
- Gaya P., Saralegui C., Medina M., Nunez M. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria spp.* in Raw Caprine Milk. *J. Dairy Science.* **79**: 1936-1941.
- Gendel S. N., Ulaszek J. (2000). Ribotype analysis of strain distribution in *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **63** : 179-185.
- Gerrit S. (2003). Dairy processing, Improving quality, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England. 546 p.
- Ghai R., Hain T., Chakraborty T. (2004). GenomeViz : visualizing microbial genomes. *BMC Bioinformatics.* **5**:198.
- Gianfranceschi M.V., D'ottavio M.C., Gattuso A., Bella A., Aureli P. (2009). Distribution of serotypes and pulsotypes of *Listeria monocytogenes* from human, food and environmental isolates (Italy 2002-2005). *Food Microbiol.* **26**: 520-526.
- Gillespie S.H., Hawkey P.M. (2006). Principles and Practice of Clinical Bacteriology, Second Edition. John Wiley & Sons, Ltd. 604 p.
- Gilmour M. W., Graham M., Domselaar G. V., Tyler S., Kent H., Trout-Yakel K. M., *et al.* (2010). High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics.* **11**:120
- Gorski L. (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes* : Phenotypic Identification. CRC Press. Boca Raton. Floride. USA. ISBN :13-978-1-4200-5140-7. p.139-168.
- Graham T., Golsteyn-Thomas E.J., Gannon V.P. et Thomas J.E. (1996). Genus and species detection of *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction assays targeting the 16S/23S intergenic spacer region of the rRNA operon. *Can. J. Microbiol.* **42** : 1155-1162.

- Graves L.M., Swaminathan B., Hunter S. (1999). Subtyping *Listeria monocytogenes*. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Ryser E. & Marth E., Eds. Marcel Dekker, New York, NY, USA. p. 279-297.
- Grimont F., Grimont P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **137** (B) : 165-175.
- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Edition Dunod.Paris . 652 p.
- Guiraud J.P., (2003).*Microbiologie alimentaire*. Ed. Dunod. Paris. ISBN 2 10 007259 5. 651p.
- Ha K.S., Park S.J., Seo S.J., Park J.H., Chung D.H.(2002).Incidence and polymerase chain reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeongnam Province of Korea. *J. Food Protect.* **65**, 1, 111-115.
- Hain T., Steinweg C., Kuenne C. T., Billion A., Ghai R., S. Chatterjee S. R., *et al.*(2006).Whole-Genome Sequence of *Listeria welshimeri* Reveals Common Steps in Genome Reduction with *Listeria innocua* as Compared to *Listeria monocytogenes*.*J. Bacteriol.* **188**(21) : 7405-7415.
- Hamdi T.M., Naïm M., Martin P., Jacquet C. (2007). Identification and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated in raw milk in the region of Algiers (Algeria). *Int. J. Food Microbiol.***116** : 190-193.
- Herro R ; (2006). Implication du PTS dans la régulation de PrfA, activateur transcriptionnel des gènes de virulence de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat de l'Université. Paris-Sud. p :18-41.
- Hantsis-Zacharov E., Halpern M. (2007). Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Appl. and Environ. Microbiol.***73**:7162-7168.
- Husu J.R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med.* **37**(B) : 276-282.
- Husu J.R., Seppänen J.T., Sivelä S.K., Rauramaa A.L. (1990). Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *J. Vet. Med. Ser.***37**(B) :268.
- Jaradat, Z.W., Schutze, G.E., and Bhunia, A.K. (2002). Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.***76** : 1
- Jemmi T., Stephan R. (2006). *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator, *Revue Scientifique et technique*- Office international des epizooties. **25**: 571-580.
- Kazmierczak M.J., Mithoe S.C., Boor K.J., Wiedmann M. (2003). *Listeria monocytogenes*^B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* **185**: 5722-5734.

- Kongo M., Malcata F.X., HoA.J., Wiedmann M.2006. Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* in São Jorge (Portugal) Cheese Production. *J. Dairy Sci.* **89**: 4456-4461.
- Kreft J., Vazquez-Boland J. A., Altrock S., Dominguez-Bernal G., Goebel W. (2002). Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **264**(2) : 109-125.
- Larpent J.P. (2000). *Listeria*. 2^{ème} édition. Lavoisier. p : 1-189.
- Larpent J. P. (2004). *Listeria*. 3^{ème} édition. Technique et documentation. Londres-Paris New York. Lavoisier. ISBN : 2-7430-065769. 227 p.
- Laukova A.,Marekova M. (2002). A bacteriocin-mediated antagonism by *Enterococcus faecium* EK13 against *Listeria innocua* in tofu. *Archiv für Lebensmittelhygiene.***53** : 28-30.
- Lebres E.H.A., Moufok F. (2000). Enquête de Listériose en Algérie. Recueil de la journée : Institut Pasteur d'Algérie face aux problèmes sanitaires de l'été. p : 11-12.
- Lebres E.H.A. (2002).Manuel des Travaux pratiques. Cours national d'hygiène et de microbiologie des aliments. Unité : Microbiologie des laits et produits laitiers. Institut Pasteur d'Algérie. 31 p.
- Lebres E.H.A. (2006). Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus dans la région centre. Thèse Doctorat en Sciences Vétérinaires. Option: Microbiologie. Centre Universitaire d'El Tarf, Algérie. 168 p.
- Lecoitre G., Le Guya der H. (2001). *Classification phylogénétique du vivant*. Ed. Belin. Paris.ISBN : 2-7011-4273-3. 537 p.
- Lecuit M., Cossart P. (2000). De cadhérine en cadhérine, la E-cadhérine porte d'entrer de *Listeria monocytogenes*. *Médecine / Sciences.* **16** : 128-130.
- Liu D., Ainsworth A.J., Austin F.W., Lawrence M.L. (2004). Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. of Food Microbiol.* **91**: 297-304.
- Liu D.(2006). Review. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* **55**: 645-659.
- Luchetta P., Maurel M. C., Higuete D. *et al.* (2005). *Evolution moléculaire*. Ed. Dunod. Paris. ISBN : 2 10 006880 6. 330 p.
- Ludwig W., Neumaier J., Klugbauer N., Brockmann E., Roller C., Jilg S., *et al.* (1994). Phylogenetic relationships of Bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATPsynthase beta-subunit genes. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **3** (4): 285-305.
- Ludwig W., Schleifer K.H., Whitman W.B. (2009). Family III. *Listeriaceae* fam. nov. *In: De VosP., GarrityG.M., JonesD., KriegN.R., LudwigW., RaineyF.A., SchleiferK.H.,*

Whitman W.B. (eds): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, second edition, vol. 3 (The *Firmicutes*), Springer, Dordrecht, Heidelberg, London, New York. p. 244.

-Madigan M et Martinko J, (2007). *Biologie des micro-organismes*. 11^{ème} édition Pearson Education France. ISBN 978-2-7440-7209-3. 1047p.

-Massa S., Cesaroni D., Poda G., Trovatelli L.D. (1990). The incidence of *Listeria spp.* in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 153-156.

-Merkl R.(2004). SIGI: score-based identification of genomic islands. *BMC Bioinformatics.* **5** : 22.

-Moshtaghi H., Mohamadpour A.A. (2007). Incidence of *Listeria spp.* in Raw Milk in Shahrekord, Iran. *Foodborne Pathog. Dis.***4**(1): 107-110.

-Moura S.M., Destro M.T., Franco B.D. (1993). Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **19**: 229-237.

-Murchie L.W., Cruz-Romeo M., Ferry J.K., Linton M., Patterson M.F., Smiddy M., Kelly A.L. (2005). High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innov. Food Sci. Emerg. Tech.* **6**: 257-270.

-Norme internationale ISO 11290-1 :1996. Partie 1 : Recherche de *Listeria* dans les denrées alimentaires. [En ligne]. Disponible à l'URL <http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail.htm?csnumber=19268>. (Consulté le 23/11/2010).

- Nucera D., Lomonaco S., Bianchi D. M., Decastelli L., Grassi M. A., Bottero M. T. *et al.* A five years surveillance report on PFGE types of *Listeria monocytogenes* isolated in Italy from food and food related environments. *Int. J. Food Microbiol.* **140** : 271-276.

-Olesen I., Thorsen L., Jespersen L. (2010). Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. *Int. J. Food Microbiol.* **141**: S60-S68.

-Oliver S.P., Jayarao B.M., Almeida R.A. (2005). Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment : food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.***2** (2) : 115-29.

-Olsen G.J., Matsuda H., Hagstrom R., Overbeek R. (1994). FastDNAm1: a tool for construction of phylogenetic trees of DNA sequences using maximum likelihood, *Comput. Appl. Biosci.* **10** : 41-48.

-Panoff J. M. (2011). Problématique transversale : Ecosystème alimentaire, Biodiversité et Santé. [En ligne]. Disponible à l'URL <<http://www.criigen.org/content/view/55/105/>>. (Consulté le 08/10/2011).

- Pierre, O. and Veit, P. (1996). Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **45**: 195-197.
- Prasad N. D., Gupta R. K. (1990). *Listeria monocytogenes* in dairy products. An overview. *Microbiol. Aliment. Nutr.* **8**,p : 383-405.
- Rahimi E., Ameri M., Momtaz H. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control.* **21** : 1448-1452.
- Rea M.C., Cogan T.M., Tobin S.(1992). Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. *J.Appl. Bacteriol* **73** : 331-336.
- Ryan K.J., Ray G.G. (2004). Sherris Medical Microbiology, An introduction to infectious diseases, 4th Edition. The McGraw-Hill Companies. 979 p.
- Ryser E. T. (1991). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in dairy products. In "Comptes rendus de la conférence internationale. *Listeria* et sécurité alimentaire". Amgar A. Ed. 13-14 juin 1991, Laval, France. Laval, ASEPT, 1991, p. 115-122.
- Saitou N., Nei M. (1987). The Neighbor-joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** (4) : 406-425.
- Sanaa M. (1993). Epidémiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Thèse Doctorat Univ. Paris XI. 207 p.
- Sant'Ana A. S., Igarashi M. C., Landgraf M., Destro M. T. Franco B. D. G. M. (2012). Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.036.
- Sanaa M., Poutrel B., Menard J.L., Serieys F. (1993). Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* **76** : 2891-2898.
- Sanaa M., Audurier A., Poutrel B., Menard J.L., Serieys F. (1996). Origin of bovine milk contamination by *Listeria monocytogenes*. *Int. Dairy Fed.* **25**: 163-179.
- Schmid M. W., Ng E. Y. W., Lampidis R., Emmerth M., Walcher M., Kreft J., *et al.* (2005). Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Systematic and Appl. Microbiol.* **28**: 1-18.
- Sela S., Yogev D., Razin S., Bercovier H. (1989). Duplication of the *tuf* gene: a new insight into the phylogeny of Eubacteria. *J. Bacteriol.* **1**: 581-4.
- Skovgaard N. (1990). Facts and trends in microbial contamination of dairy products. International Dairy Federation Bulletin 250, 31-33. International Dairy Federation, Square Vergote 41, 1040 Brussels, Belgium.
- Singleton P. (1999). *Bactériologie*. 4^{ème} Edition. Dunod. Paris. 415 p.

- Steinweg C., Kuenne C. T., Billion A., Mraheil M. A., Domann E., Ghai R. (2010). Complete Genome Sequence of *Listeria seeligeri*, a Nonpathogenic Member of the Genus *Listeria*. *J. Bacteriol.* **192** (5) : 1473-1474.
- Stephan R., Bühler K. (2002). Prävalenz von *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes* in Bestandesmilchproben aus der Nordostschweiz. *Arch. Lebensmittelhyg.* **53**: 62-65.
- Sutra L., Federighi M., Jouve J.L. (1998). Manuel de bactériologie alimentaire. Edition, Polytechnica, Paris. p.133-159.
- Van Kessel J.S., Karns J.S., Gorski L., McCluskey B.J., Perdue M.L. (2004). Prevalence of *Salmonellae*, *Listeria monocytogenes*, and fecal coliforms in bulk tank milk on US dairies. *J. Dairy Sci.* **87** : 2822-2830.
- Vardar-Ünlü G., Ünlü M., Bakici M.Z. (1998). Incidence of *Listeria* spp. from Raw Milk in Sivas. *Tr. J. Med. Sciences.* **28** : 389-392.
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez- Bernal G., et al. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**: 584-640.
- Waak E., Tham W., Danielsson-Tham M.L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** : 3366-3370.
- Vilar, M. J., Yus, E., Sanjuan, M. L., Dieguez, F. J., Rodriguez-Otero, J. L. (2007). Prevalence of and risk factors for *Listeria* species on dairy farms. *J. Dairy Sci.* **90** : 5083–5088.
- Wagner M., McLauchlin J. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*. Ed. Dougyou Liu. London, New York : Boca Raton. 554p. ISBN : 978-1-4200-5140-7.
- Weiss J., Seeliger H.P.R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl. Microbiol.* **30**, 1, 29-32
- Wiedmann, M., Bruce, J. L., Keating, C., Johnson, A. E., McDonough, P. L., Batt, C. A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.* **65**: 2707-2716.
- Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America.* **12**: 4576-9.
- Yoshida T, Sato M, Hirai K. (1998). Prevalence of *Listeria* species in raw milk from farm bulk tanks in Nagano prefecture. *J Vet Med Sci.* **60**(3):311-314.

ANNEXE A : Description des sites de l'élevage



L'alimentation à base de ensilage est beaucoup plus utilisée les mois d'hiver.



L'alimentation animale est renforcée par les suppléments alimentaires.



Française Frisonne Pie noir et Montbéliard Pie rouge élevées dans l'oasis d'El Hadjeb dans la région de Biskra. Les animaux profitent, en dehors des locaux, des herbes vertes disponibles au printemps.



Nature du revêtement des sols et des murs dans les locaux d'élevage, et état général de l'hygiène. La présence d'excréments sur les téguments de l'animal et le sol et un indice d'une mauvaise hygiène.



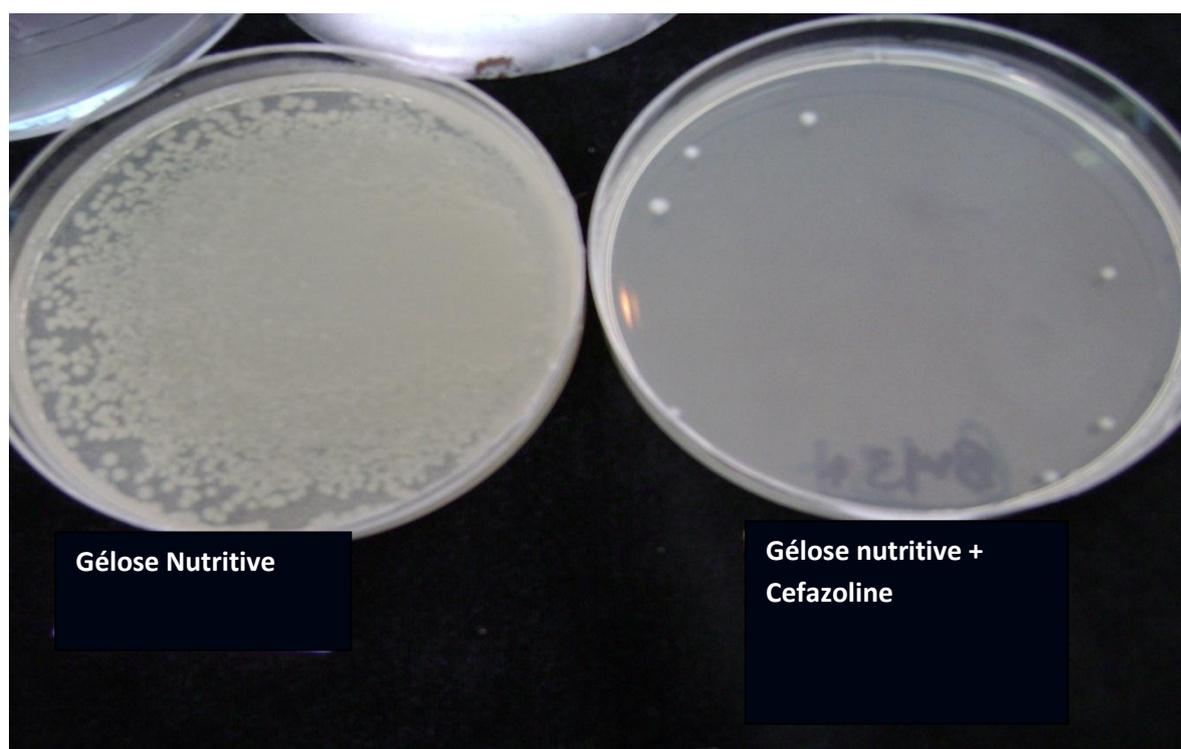
La traite automatique dans les fermes laitières.

Prélèvements

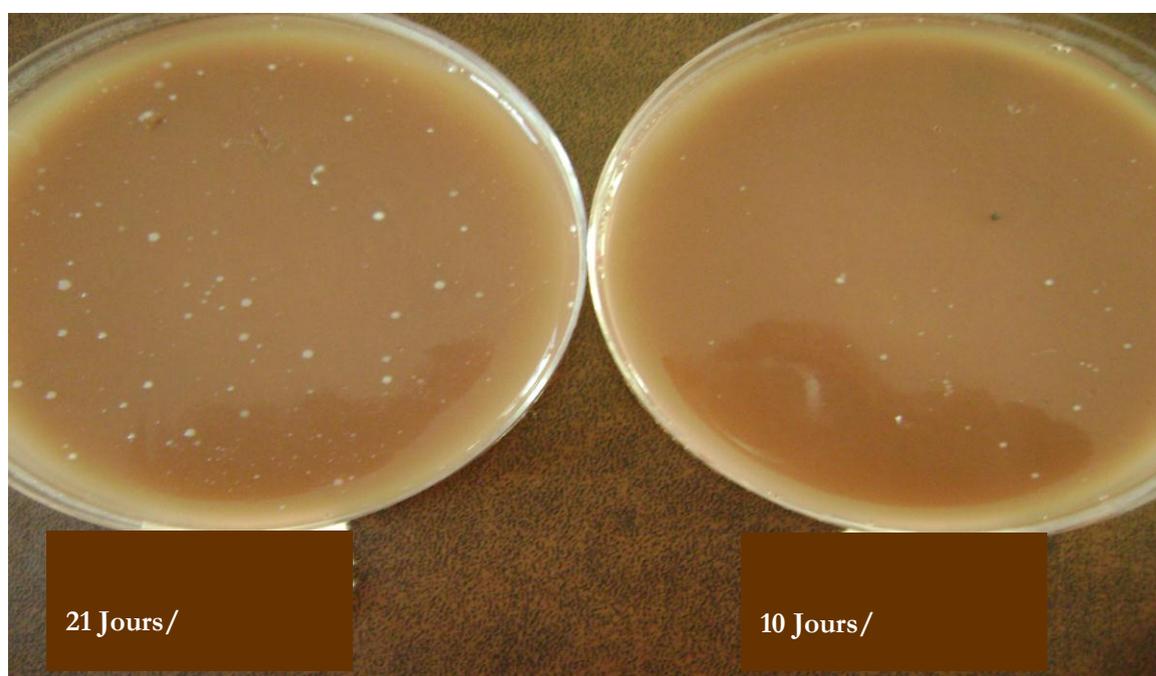


Prélèvement individuel du lait cru des quatre pis de la vache laitière. Les premiers jets sont éliminés et 25 mL de lait sont récupérés dans un flacon stérile.

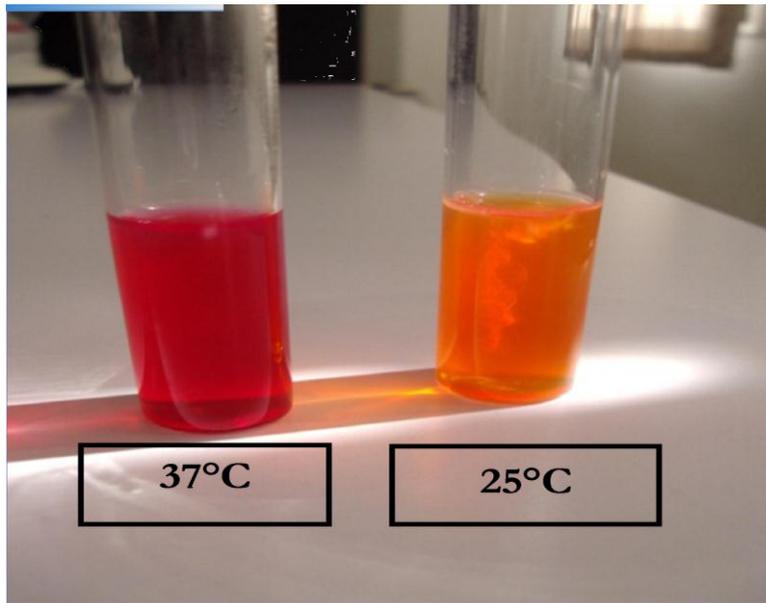
Annexe B : Analyses bactériologiques



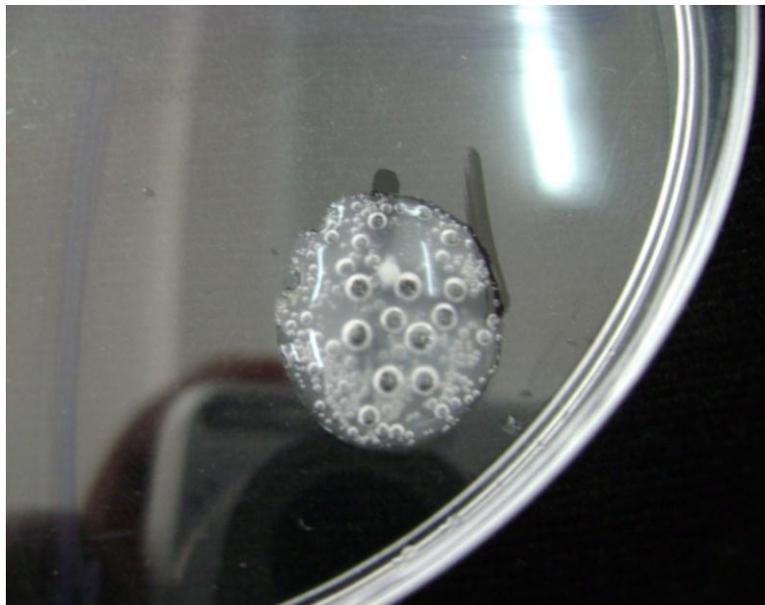
L'addition de la Cefazoline élimine les bactéries sensibles. Seules les bactéries résistantes peuvent croître, et parmi elles *Listeria spp.* (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra).



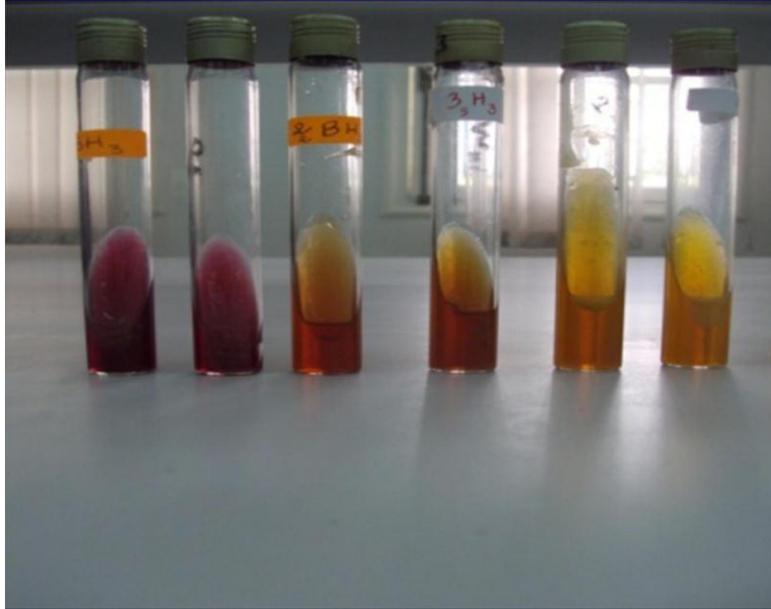
psychrotrophes sur gélose à 5% de sang de cheval additionnée de Cefazoline (Photo réalisée au Laboratoire d'Hygiène de Mila).



Recherche de la Mobilité sur gélose Mannitol mobilité à 25 et 37°C (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra)



Teste de la catalase. Le dégagement gazeux est en faveur de la présence de l'enzyme catalase dans le métabolisme respiratoire bactérien (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra).



Le teste TSI permet de mettre en évidence en 24h l'attaque du glucose, du lactose et du saccharose ainsi que la production d'hydrogène sulfuré et du gaz (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra).

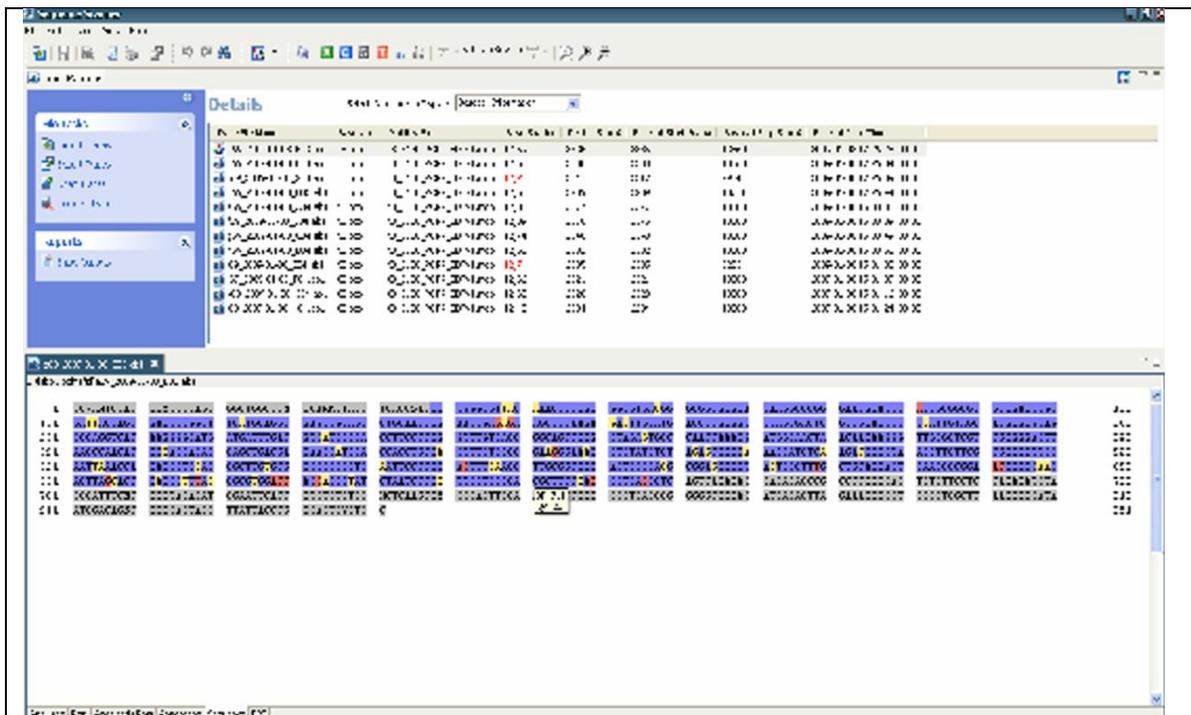


Caractère hémolytique de *Proteus spp.* mis en évidence sur gélose au sang. Les zones d'éclaircissement autour des colonies sont synonymes d'hydrolyse des constituants du sang (Photo réalisée au Laboratoire d'Hygiène de Mila).



Etude de la résistance aux antibiotiques des souches isolées (Photo réalisée au Département de Biologie à l'université de Biskra).

Annexe C : Biologie moléculaire et Bioinformatique



Annexe C1 : La sélection de la séquence d'ADNr 16S



Annexe C2 : Tracé électrophorétique en utilisant le logiciel Applied Biosystem

Annexe C3 : Résultats détaillés de BlastN (les dix souches à identifier sont codées de 1 à 10. La souche proposée par BlastN comprend les valeurs de S, E-alue et %id)

<p>>1</p> <p>TTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGGGCGTGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTTAAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTIONCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCAACTAAA TGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAA CCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGG TAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGAGT TTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAGTGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCA AACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGAGCCT CAGCGTC</p> <p>>gi 343200102 ref NR_040789.1 <i>Enterococcus faecalis</i> strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence s=1223, E=0,0 %id=99</p> <p>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCAACGCTTCTTTCTCCCG AGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGG ATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCG GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG CCGACCTGAGAGGGTGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG GAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCTCTCTG GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAG TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCGAAGC AACCGGAAGAACCTTACCAGGCTTACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAAGT GACAGTGGTGCATGTTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATT GTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTGCCTAGACCGCGAG GTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGT TTGTAACACCCGAAGTCCGGTGGAGTAACTTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGAAG TCGTAACAAGGTAACC</p>
<p>>2</p> <p>ACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGGGCGTGTG CTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAACTGAGAGAAGCTTT AAGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTIONCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATA AGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCAACTA AATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC AACCATGACACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGATGTCAAGACCT GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCTTTGA GTTTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCT CCAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCCCC</p> <p>>gi 343200102 ref NR_040789.1 <i>Enterococcus faecalis</i> strain JCM 5803 16S ribosomal RNA, partial sequence s=1201, E=0,0 %id=99</p> <p>AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCAACGCTTCTTTCTCCCG AGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGG ATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCCG GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGTAAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG CCGACCTGAGAGGGTGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG GAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA</p>

CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGT
GACAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
GTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAG
GTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGAAG
TCGTAACAAGGTAACC

>3

CTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGAGAGAAGCTTTA
AGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAA
ATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTC
CAACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGAGC
CT

>gi|343200102|ref|NR_040789.1| *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803 16S
ribosomal RNA, partial sequence s=1225, E=0,0 %id=99

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCG
AGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGG
ATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGG
GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG
CCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAAT
CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTT
GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTTCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG
GAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG
GTCTGTAAGTGCAGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGT
GACAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
GTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCGCGAG
GTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGAAG
TCGTAACAAGGTAACC

>4

CTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGC
TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGGCTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAGTGGAGAGAAGCTTTA
AGAGATTTGCATGACCTCGCGGTCTAGCGACTCGTTGTACTTCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAA
ATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA
ACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAGCTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG
TTTCAACCTTGCAGTCTACTCCCCAGGCGGAGTGTCTAATGCGTTTGTGTCAGCACTGAAGGGCGGAAACCTC
CAACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCC

>gi|343200102|ref|NR_040789.1| *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803 16S
ribosomal RNA, partial sequence s=1199, E=0,0 %id=99

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCTTCTTTCTCCCG
AGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACTACCCATCAGAGGGGG
ATAACACTTGAAACAGGTGCTAATACCGCATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGG

GTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG
CCGACCTGAGAGGGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTT
GTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAAGCGAGCGCAGGCGGTTT
CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAG
GAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTG
GTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
CGATGAGTGTAAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCTGAGCAAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAG
TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGAAGC
AACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCCTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAAGT
GACAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATT
GTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAGTCGCTAGACCCGCGAG
GTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCT
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGT
TTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGAAG
TCGTAACAAGGTAACC

>5

ACTTCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCG
GTTTGTACCCGGCAGTCTCGCTAGAGTGCCCAACTAAATGATGGCAACTAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGG
GACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGAAAG
CTCTATCTCTAGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGC
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTCAACCTTGCGGTTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTT
ATGCGTTTTGCTGCAGCACTGAGGGCGGAAACCCCTCCACACTTA

>gi|343198952|ref|NR_044121.1| *Enterococcus camelliae* strain FP15-1 16S
ribosomal RNA, partial sequence, S=752, E=0,0 %id=99

TATACATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAAGAGGAGTAGCGAACGGGTGAGT
AACACGTGGGTAACTGCCATCAGCGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGCATAATGCTTTTTCT
CACATGAGAGAGAGCTGAAAGGCGCTTTTTCGCTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGTTAGGG
TAACGGCCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGCATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGACG
GTATCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGA
TTTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTTC
ATTGGAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCATAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGTG
CAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCG
CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCAC
TCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGAT
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACT
GCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGC
TACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCGAATCTCTTAAAACCTCTCTCAGTTCGGATTG
TAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCC
GGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGAGGCC
AGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC

>6

GACWCCACTTCTGGTGCACAAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCG
CGGCATTCTGATCCCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAT
CGGCTTTTTGAGATTAGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCT
GGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCGCTTCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTTAAAGTTC
CCGACATTACTCGCTGGCAAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGA
GCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTCTTACTATG
TCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
TTCATTTGAGTTTTAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACTAAAGCCT
CAAAGGCCCAACGGCT

>gi|343201661|ref|NR_042387.1| *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016
strain : NCCB 22016 16S ribosomal RNA, partial sequence s=1131, E=0,0

%id=100

TCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGAGAGGTAGCTTGCTACTGAT
CTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAA
TACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAG
CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTA
GAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCA
AGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTTA
ACTTGGGAATTCGATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAA
TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCA
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAG
GCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATT
GACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACA
TAGTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTACATACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTTTCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTCGGGA
ACTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTAGCGATAGGATGCTAATCTCAAAAAGCCGAT
CGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCG
GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTTGTGACCAGAAGTAGCTAGCCT
AACTGCAAAGAGGGCGGTTACCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAAC
CTGCGGCTGGATCAC

>7

TACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACTACTGGAA
ACGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATGAACCCA
GGTGGGATTARCTAGTTGGTGGAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTARCTGGTCTGAGAGGATGATCAGC
CACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCC
TGATGCMGCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTTGGTA
GCTAATAACTGCCAGTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGAAAGC
CCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACCTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCC

>gi|343206253|ref|NR_044845.1| *Aeromonas veronii* 16S ribosomal RNA, complete sequence

S=1186, E=0,0 %id=99

GAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGAAAAGTAG
CTTGCTACTTTTGCCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGGATCTGCCAGTCGAGGGGGATAACTAC
TGAAACGGTAGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGATTGGATGAA
CCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAA
ACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAAGGTT
GGTAGCTAATAACTGCCAGCTGTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCAGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCGAGGCGGTTGGATAAGTTAGATGTGA
AAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCATTTAAAACCTGTCCAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAG
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAG
GCTGTGTCCTTGAGACGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAA
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTA
CCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGCCTTCGGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGG
CTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTGTCTTTGTTGCCAGCA
CGTAATGGTGGGAACTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGG
CCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAGCGATAGTGGAGCAATC
CCAAAAGCGCGTCTGATCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAA
TCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAG
AAGTAGATAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGATTGACTGGGGTGAAGTCGTAACNNGGTA
ACCCTAGGGNAACCTGCGGCTGGATCACCTCC

>8

GGWGAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGAT
AACGTCCGGAAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATC

AGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGA
GGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT
GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGG
AAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCAGCAAGTTG
GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGGA
ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGC

>gi|219846486|ref|NR_026078.1| *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071 16S
ribosomal RNA, complete sequence, s=1074, E=0,0 %id=98

GAACTGAAGAGTTTGTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCAGCAGGGGCCTTCAACACATGCAAGTTCGAGCTTAT
GAAGGGAGCTTGCCTTGGATTTCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAAC
GTCCGGAACCGCCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAAAGTCGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGA
TGAGCCTAGGTTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGA
TGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGG
CGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAAG
GGCAGTAAGTTAATACCTTGTGTTTTGACGTTACCAACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG
GTAATACGAAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAAGTGGTTCAGCAAGCTTGATG
TGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAAAAGCTACTGAGCTAGAGTACGGTAGAGGTGGTAGAATTT
CCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGTACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGTCGACTAGC
CGTTGGGATCCTTGAGATCTTAGTGGCGCACGTAACCGGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT
AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACC
TTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAAGTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACAGAGACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCA
GCACCTCGGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCCGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGTGGGAGCTAA
TCCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTG
AATCAGAATGTACGGTGAATACGTCCTCCCGGCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGTCTCC
AGAAGTAGTCTAGTCTAAGCAAGGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGG
TAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA

>9

GGGAGCTTGTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAC
TCCGGGAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACC
ACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAA^YGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTA
GGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCT
TAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGA

>gi|343202352|ref|NR_042638.1| *Brevibacterium halotolerans* strain DSM 8802
16S ribosomal RNA, complete sequence, s=1105, E=0,0 %id=99

GTTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGC
TCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAAC
CGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCCTTACAGAT
GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGTGCCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGT
GATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACA
AGTACCCTTCAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTAAGTCTGAT
GTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAAT
CCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTA
AGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTTCGCAAG
ACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAACCGGAAGA
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGT
GCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG
CCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCC
AATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCCAGGAGTGTGTAACA

CCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTTACTCT

Ou

**>gi|219856874|ref|NR_024693.1| *Bacillus mojavensis* strain IFO15718 16S
ribosomal RNA, partial sequence s=1105, E=0,0 %id=99**

TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTG
ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGC
TAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCC
GCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGT
CTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACC
GTTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAA
GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGT
GTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA
GGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGT
AGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAA
ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACCGGAAGAACCTTA
CCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGTTGCATGG
TTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCA
TTCAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCC
CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAAACAAAGGGCAGCAAAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCC
ACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAA
GTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG
CCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA

>10

CTGATCTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGAGTGAGATAGGGTTT
CTGGGATTGGCTTGCCCTCGCGGGTTTGACGCCCTCTGTCCCTACCATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTCGTA
AGGGCCATGATGACTTGACGTTCATCCCCACCTTCCCTCCGGTTTTGTCACCGGCGGTCTCCTTAGAGTTCCCACCAT
TACGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTGTTGAGTTCGAGTTCGGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAAGTTCTCGACATGTCAAGAC
CAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATACTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTTT
GAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTACTCCCCAGGCGGCGAACTTAACGCGTTAGCTTCGATACTGCGTGCCAAATTC
ACCCAACATCCAGTTTCGCATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCCTCCCACGCTTTCG
TGCCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCTGCCTTCGCCATGGATGTTTCTCCCGATCTCTACGCATTTCACTG
CTACACCGGAATTCACCTACCCTCTACCACACTCTAGTCGCCAGTATCCACTGCAATTCAGGTTGAGCCCA
GGGCTTTCACAACAGACTTAACAACACCTACGCACGC

>STENO

GTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCTCTTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAATCT
ACCTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTTCGGGTGAAAAGCAGGGGACCT
TCGGGCCTTGCGCGGATAGATGAGCCGATGTGCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAAGGCCACCAAGGCGACGAT
CCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAG
CCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCGCTTGTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGCACCGGCT
AACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTA
GGTGGTTGTTAAGTCTGTTGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATTGCAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTG
TGGTAGAGGGTAGTGAATTCGCGGTGTAGCAGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACATCCATGGCGAAGGCA
GCTACCTGGACCAACACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCAC
GCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGC
CTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATGTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCG
GGAACCTGCAACACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC
GCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACTCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTAACAATGGTAGGGACAGAGGGC
TGCAAAACCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCC
TCACACCATGGGAGTTTGTGACACCAGAAGCAGGTAGC

Selon le code IUPAC: **W**= A ou T, **R**= A ou G, **M**= A ou C, **Y**= T ou C

Annexe C4 : Alignement global des 10 séquences

Annexe C.4.1 BlastN/Sequencel vs *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803

```

          10          20          30
seq1  TTCGGGTGTT-----ACAAACTCTCGTGGTGTG-----AC
      :  :  :          :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
          10          20          30          40          50          60

          40
seq1  G-----GGCGGT---GTGTACA
      :          :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero GCTTCTTTTCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGGGTGAGTA
          70          80          90          100          110          120

          50          60          70          80
seq1  AGGCCCGGG-AACGTATTCACC-GCGGCG-----TGCTGATCCGCG
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero ACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGC
          130          140          150          160          170          180

          90          100          110
seq1  ATTAC----TA-----GCGATTCCGGCT----TCATGCAG
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero ATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGAT
          190          200          210          220          230          240

          120
seq1  G----CGAGTTGCA-----GCC----TGCA-AT
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero GGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATAG
          250          260          270          280          290          300

          130          140          150
seq1  CCGAACTGAGAG-----AAGCTTTAAGAGA-
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGAG
          310          320          330          340          350          360

          160
seq1  -----TTTGCA-----TGACCTCGC-----
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero GCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTG
          370          380          390          400          410          420

          170          180
seq1  -----GGTCT---AGCG---ACTC-GTTGT-----
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero AAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACTG
          430          440          450          460          470          480

          190          200          210
seq1  -ACTTCCCATT---GTAGC-----ACGTGT---GTAGCCCAGG
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero AACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGG
          490          500          510          520          530          540

          220          230
seq1  TCATA---AGG-GGCATGAT-----GATTT-----
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero TAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTT
          550          560          570          580          590          600

          240          250
seq1  -----GACGTCATCCCCACC-----
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
Entero CTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGAC
          610          620          630          640          650          660

seq1  -----TTCC-----
      :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :

```

```

Entero  TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
          670      680      690      700      710      720
seq1    -----TCCGGTTTGTACCCGGC----AGTCTCGCTAGAG
          :: :: : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCG
          730      740      750      760      770      780
          290      300      310
seq1    TGC----CCAAC-----TAAATGATGGCAACTAACA
          :: : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGT
          790      800      810      820      830      840
          320      330      340      350
seq1    AT---AAGGGTTGCGCTCGT---TGCGGGACTTAACCCAACAT---CTC-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  GTTGGAGGGTTTCCGCCCTTTCAGTGTCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAG
          850      860      870      880      890      900
          360      370
seq1    -ACGAC-----ACGAGCTGACG-----ACAACC-----
          : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  TACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATG
          910      920      930      940      950      960
          380      390      400
seq1    -----ATGCACC-----ACCT-----GTCA-----CTTTGTCCCCGA-A
          : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  TGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTA
          970      980      990      1000      1010      1020
          410      420      430      440      450
seq1    GGGAAAGCTCTATCTCT-----AGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGGT
          : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  GAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
          1030      1040      1050      1060      1070      1080
          460      470      480
seq1    AAGGTTCT---TCGCGTT-----GCTTCGAATTAAACC-----ACATGC-----
          :: : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCAT
          1090      1100      1110      1120      1130      1140
          490      500      510
seq1    -----TCCACCGCTTGTGCGGGCCCC-----CGTC
          :: : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  TTAGTTGGGCACCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
          1150      1160      1170      1180      1190      1200
          520      530      540
seq1    AATTC-----CTT-----TGAGTTTCAACCTTGC-----GGTCGTAC-----
          :: : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGAG
          1210      1220      1230      1240      1250      1260
          550      560      570
seq1    TCCCCAGGCGGAGTG-----CTTAGTGCGTTT-----GCT
          : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  TCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGCT
          1270      1280      1290      1300      1310      1320

          580      590      600      610
seq1    GCAGCAC-----TGAAGGGCGGAACCTCCAACAC-----TTAGCACTCATCGTT---
          : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero  GCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAA
          1330      1340      1350      1360      1370      1380
          620      630      640
seq1    TACG-----GCGTGG-----ACTACCAGGGTATCTAAT-----

```

```

      ::::      : : : :      : : : : : : : : : :
Entero TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAG
      1390      1400      1410      1420      1430      1440

      650      660      670
seq1 -----CCTGTTTGCTCCCCAC-----GCTTTCG----AG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero TCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGAAG
      1450      1460      1470      1480      1490      1500

      680
seq1 CCTCAGC---GT---C
      : : : : : :
Entero TCGTAACAAGGTAACC
      1510

```

Annexe C.4.2 BlastN/Sequence2 vs *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803

```

      10
seq2 A-----CTTCGGGTGT-----TACA-----AAC
      :      : : : : : : : : : : : : : :
Entero AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
      10      20      30      40      50      60

      20      30      40
seq2 TCTCGT-----GGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
      : : : : : : : : : : : : : :
Entero GCTTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGG-GTGAGT
      70      80      90      100      110

      50      60      70      80
seq2 AAGGCCCGGG-AACGTATTCACC-GCGGCG-----TGCTGATCCGC
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero AACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCG
      120      130      140      150      160      170

      90      100      110
seq2 GATTAC---TA-----GCGATTCCGGCT-----TCATGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero CATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTGCTGATGGA
      180      190      200      210      220      230

      120      130
seq2 GG----CGAGTTGCA-----GCC----TGCA-A
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
      240      250      260      270      280      290

      140      150
seq2 TCCGAAGTGAAG-----AAGCTTTAAGAGA
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGA
      300      310      320      330      340      350

      160      170
seq2 -----TTTGCA-----TGACCTCGC-----
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT
      360      370      380      390      400      410

      180
seq2 -----GGTCT---AGCG---ACTC-GTTGT-----
      : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACT
      420      430      440      450      460      470

      190      200      210
seq2 --ACTTCCCATT---GTAGC-----ACGTGT---GTAGCCAG

```

```

      :: : : : : :      : : : : :      : : : : :      : : : : :
Entero  GAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
      480      490      500      510      520      530
      220      230      240
seq2    GTCATA---AGG-GGCATGAT-----GATTT-----
      :: : : : : :      : : : : :
Entero  GTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT
      540      550      560      570      580      590
      250
seq2    -----GACGTCATCCCCACC-----
      : : : : :      : : : : :
Entero  TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA
      600      610      620      630      640      650
      260
seq2    -----TTCC-----
      : : : : :
Entero  CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
      660      670      680      690      700      710
      270      280
seq2    -----TCCGGTTTGTACCCGGC---AGTCTCGCTAGA
      : : : : :      : : : : :
Entero  GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGC
      720      730      740      750      760      770
      290      300      310
seq2    GTGC---CCAAC-----TAAATGATGGCAACTAAC
      : : : : :      : : : : :
Entero  GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
      780      790      800      810      820      830
      320      330      340      350
seq2    AAT---AAGGGTTGCGCTCGT---TGCGGGACTTAAACCCAACAT---CTC-----
      : : : : :      : : : : :
Entero  TGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
      840      850      860      870      880      890
      360      370
seq2    --ACGAC-----ACGAGCTGACG-----ACAACC-----
      : : : : :      : : : : :
Entero  GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCAT
      900      910      920      930      940      950
      380      390      400
seq2    -----ATGCACC-----ACCT-----GTCA-----CTTTGTCCCCGA-
      : : : : :      : : : : :
Entero  GTGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCT
      960      970      980      990      1000      1010
      410      420      430      440      450
seq2    AGGGAAAGCTCTATCTCT-----AGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGG
      : : : : :      : : : : :
Entero  AGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGCAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
      1020      1030      1040      1050      1060      1070
      460      470      480
seq2    TAAGGTTCT---TCGCGTT-----GCTTCGAATTAAACC-----ACATGC-----
      : : : : :      : : : : :
Entero  TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
      1080      1090      1100      1110      1120      1130
      490      500      510
seq2    -----TCCACCGCTTGTGCGGGCCCC-----CGT
      : : : : :      : : : : :
Entero  TTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
      1140      1150      1160      1170      1180      1190
      520      530      540
seq2    CAATTC-----CTT-----TGAGTTTCAACCTTGC-----GGTCGTAC-----
      : : : : :      : : : : :

```

```

Entero CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGA
      1200      1210      1220      1230      1240      1250
          550      560                          570
seq2 -TCCCCAGGCGGAGTG-----CTTAATGCGTTT-----GC
      :: : :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCGGATTGCAGGC
      1260      1270      1280      1290      1300      1310

          580          590      600          610      620
seq2 TGCAGCAC-----TGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACAC-----TTAGCACTCATCGTT-
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero TGCAACTCGCCTGCATGAAGC-CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG
      1320      1330      1340      1350      1360      1370

          630          640      650
seq2 --TACG-----GCGTGG-----ACTACCAGGGTATCTAAT-----
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGA
      1380      1390      1400      1410      1420      1430

          660
seq2 -----CCTGTTTG-----CTCC-----
      :: : :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Entero AGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGA
      1440      1450      1460      1470      1480      1490

seq2 -----CC
      : :
Entero AGTCGTAACAAGGTAACC
      1500      1510

```

Annexe C.4.3 BlastN/Sequence3 vs *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803

```

seq3 -----CTTCGGGTGT-----TACA-----AAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
      10      20      30      40      50      60

      20          30      40
seq3 TCTCGT-----GGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero GCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACCTCAATTGGAAAGAGGAGTGCGCGACGG-GTGAGT
      70      80      90      100      110

      50      60      70          80
seq3 AAGGCCCGGG-AACGTATTCACC-GCGGCG-----TGCTGATCCGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCG
      120      130      140      150      160      170

          90          100
seq3 GATTAC----TA-----GCGATTCCGGCT-TC-----A
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero CATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA
      180      190      200      210      220      230

      110      120
seq3 TGCAGGCGAGTTGCA-----GCC----TGCA-A
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
      240      250      260      270      280      290

      130      140          150
seq3 TCCGAAGTGAAGAG-----AAGCTTTAAGAGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGA
      300      310      320      330      340      350

          160          170
seq3 -----TTTGCA-----TGACCTCGC-----

```

```

      :   :::           :   :   :   :   :
entero GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT
360      370      380      390      400      410
      180
seq3  -----GGTCT----AGCG----ACTC-GTTGT-----
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACT
420      430      440      450      460      470
      190      200      210
seq3  --ACTTCCCATT--GTAGC-----ACGTGT--GTAGCCCAG
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
480      490      500      510      520      530
      220      230      240
seq3  GTCATA---AGG-GGCATGAT-----GATTT-----
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTT
540      550      560      570      580      590
      250
seq3  -----GACGTCATCCCCACC-----
      :   :   :   :   :   :
entero TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA
600      610      620      630      640      650

seq3  -----TTCC-----
      :   :   :   :   :
entero CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
660      670      680      690      700      710
      260      270      280
seq3  -----TCCGGTTTGTACCCGGC---AGTCTCGCTAGA
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGC
720      730      740      750      760      770
      290      300      310
seq3  GTGC----CCAAC-----TAAATGATGGCAACTAAC
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
780      790      800      810      820      830
      320      330      340      350
seq3  AAT---AAGGGTTGCGCTCGT---TGCGGGACTTAACCCAACAT---CTC-----
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero TGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
840      850      860      870      880      890
      360      370      380
seq3  --ACGAC-----ACGAGCTGACG-----ACAACC-----AT
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCAT
900      910      920      930      940      950
      390      400
seq3  GC-----ACCA---CCTGTCA--CTTTGTCCCCGA-
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GTGTTTAATTCTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCT
960      970      980      990      1000      1010
      410      420      430      440      450
seq3  AGGGAAAGCTCTATCTCT-----AGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGG
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero AGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGTGGTGCATGGTTGTCGTGAGCTCG
1020      1030      1040      1050      1060      1070
      460      470      480
seq3  TAAGGTTCT---TCGCGTT-----GCTTCGAATTAAACC-----ACATGC-----
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

```

```

entero TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
1080      1090      1100      1110      1120      1130
          490      500
seq3 -----TCCACCGCTTGTGCGGGCCCC-----CGT
          :: : ::   ::: : :   :
entero TTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
1140      1150      1160      1170      1180      1190
          520      530      540
seq3 CAATTC-----CTT-----TGAGTTTCAACCTTGC-----GGTCGTAC-----
          ::: : :   :::   : : : : : : : : :   : :   : : : :
entero CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGA
1200      1210      1220      1230      1240      1250
          550      560      570
seq3 -TCCCCAGGCGGAGTG-----CTTAATGCGTTT-----GC
          : : : : : : : :   : : : : : : : :   : :
entero GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTCCGATTGCAGGC
1260      1270      1280      1290      1300      1310
          580      590      600      610      620
seq3 TGCAGCAC-----TGAAGGGCGGAAACCCCTCCAACAC-----TTAGCACTCATCGTT-
          : : : : :   : : : :   : : : : : : : :   : :   : : : : : : :
entero TGCAACTCGCCTGCATGAAGC-CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG
1320      1330      1340      1350      1360      1370
          630      640
seq3 --TACG-----GCGTGG-----ACTACCAGGGTATCTAAT-----
          : : : :   : : : :   : : : : : : : :   : : : : : : : :
entero AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGA
1380      1390      1400      1410      1420      1430
          650      660      670
seq3 -----CCTGTTTG-----CTCCCCACGCT-----TTCGAGC--
          : : : : :   : : : :   : : : : : : : :   : : : :
entero AGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGA
1440      1450      1460      1470      1480      1490

seq3 -----CT
          :
entero AGTCGTAACAAGGTAACC
1500      1510

```

Annexe C.4.4 BlastN/Sequence4 vs *Enterococcus faecalis* strain JCM 5803

```

seq4 -----CTTCGGGTGT-----TACA-----AAC
          : : : :   : : : :   : : : :
entero AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC
          10      20      30      40      50      60
          20      30      40
seq4 TCTCGT-----GGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
          : :   : : : : : : : :
entero GCTTCTTTCCCTCCCGAGTGCTTGCACTCAATTGGAAAGAGGAGTGGCGGACGG-GTGAGT
          70      80      90      100      110
          50      60      70      80
seq4 AAGGCCCGGG-AACGTATTCACC-GCGGCG-----TGCTGATCCGC
          : : : : : : : : : :   : : : :
entero AACACGTGGGTAACCTACCCATCAGAGGGGGATAAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCG
120      130      140      150      160      170
          90      100      110
seq4 GATTAC----TA-----GCGATTCCGGCT-----TCATGCA
          : : : :   : : : :   : : : :
entero CATAACAGTTTATGCCGCATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTTTCGGGTGTCGCTGATGGA
180      190      200      210      220      230
          120
seq4 GG----CGAGTTGCA-----GCC----TGCA-A

```

```

      :      :: : ::::
entero TGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCATA
      240      250      260      270      280      290
      130      140      150
seq4 TCCGAACTGAGAG-----AAGCTTTAAGAGA
      :::: :::::
entero GCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCTACGGGA
      300      310      320      330      340      350
seq4 -----TTTGCA-----TGACCTCGC-----
      :      ::      :::: :
entero GGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGT
      360      370      380      390      400      410
      180
seq4 -----GGTCT----AGCG----ACTC-GTTGT-----
      :: : : : : : : : :
entero GAAGAAGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGACGTTAGTAACT
      420      430      440      450      460      470
      190      200      210
seq4 --ACTTCCATT---GTAGC-----ACGTGT---GTAGCCCAG
      :: :::: : : : : : : : :
entero GAACGTCCCCTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCGC
      480      490      500      510      520      530
      220      230      240
seq4 GTCATA---AGG-GGCATGAT-----GATTT-----
      :: : : : : : : : :
entero GTAATACGTAGGTGGCAAGCTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGCGGTT
      540      550      560      570      580      590
      250
seq4 -----GACGTCATCCCCACC-----
      :: : : : : : :
entero TCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGA
      600      610      620      630      640      650
seq4 -----TTCC-----
      ::::
entero CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATG
      660      670      680      690      700      710
      260      270      280
seq4 -----TCCGGTTTGTACCGGC---AGTCTCGCTAGA
      :: : : : : : : : :
entero GAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGC
      720      730      740      750      760      770
      290      300      310
seq4 GTGC----CCAAC-----TAAATGATGGCAACTAAC
      :: : : : : : : : :
entero GTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAG
      780      790      800      810      820      830
      320      330      340      350
seq4 AAT---AAGGGTTGCGCTCGT---TGCGGGACTTAACCCAACAT---CTC-----
      : : : : : : : : : : : : : :
entero TGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
      840      850      860      870      880      890
      360      370
seq4 --ACGAC-----ACGAGCTGACG-----ACAACC-----
      :::: : : : : : : : :
entero GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAGCGGTGGAGCAT
      900      910      920      930      940      950
      380      390      400
seq4 -----ATGCACC-----ACCT-----GTCA-----CTTTGTCCCCGA-

```

```

      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero GTGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCT
      960      970      980      990      1000      1010
      410      420      430      440      450
seq4   AGGGAAAGCTCTATCTCT-----AGAGTGGTCAAAGGATGTCAAGACCTGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCG
      1020      1030      1040      1050      1060      1070

      460      470      480
seq4   TAAGGTTCT---TCGCGTT-----GCTTCGAATTAAACC-----ACATGC-----
      :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
entero TGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCATCA
      1080      1090      1100      1110      1120      1130
      490      500      510
seq4   -----TCCACCGCTTGTGCGGGCCCC-----CGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero TTTAGTTGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGT
      1140      1150      1160      1170      1180      1190
      520      530      540
seq4   CAATTC-----CTT-----TGAGTTTCAACCTTGC-----GGTCGTAC-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero CAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGAAGTACAACGA
      1200      1210      1220      1230      1240      1250
      550      560      570
seq4   -TCCCCAGGCGGAGTG-----CTTAATGCGTTT-----GC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero GTCGCTAGACCGCGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCTCTCAGTTTCGGATTGCAGGC
      1260      1270      1280      1290      1300      1310
      580      590      600      610      620
seq4   TGCAGCAC-----TGAAGGGCGGAAACCCTCCAACAC-----TTAGCACTCATCGTT-
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero TGCAACTCGCCTGCATGAAGC-CGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTG
      1320      1330      1340      1350      1360      1370
      630      640
seq4   --TACG-----GCGTGG-----ACTACCAGGGTATCTAAT-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGA
      1380      1390      1400      1410      1420      1430
      650      660
seq4   -----CCTGTTTG-----CTCC-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AGTCGGTGAGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGATAGATGATTTGGGTGA
      1440      1450      1460      1470      1480      1490

seq4   -----CC
      : :
entero AGTCGTAACAAGGTAACC
      1500      1510

```

Annexe C.4.5 BlastN/Sequence5 vs *Enterococcus camelliae* strain FP15-1

```

      10
seq5   -----ACTTC-----CCATT-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero TATACATGCAAGTTGAACGCTTCTTTCTTATCGAACTTCGGTTCACCAAGAAAAGAGGAGT
      10      20      30      40      50      60
      20

```

```

seq5 -----GTAGCACGTGTGTAGCC-----
      ::: : : : : : : : : : : : :
entero AGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGCGGGGGATAACACTTGGAAA
      70      80      90      100      110      120
seq5 30 CAGGT-----CATAAGG-----GGCA-----40
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero CAGGTGCTAATACCGCATAATGCTTTTTCTCACATGAGAGAGAGCTGAAAGGCGCTTTTG
      130      140      150      160      170      180
seq5 -----TGATGATTTGAC-----
      : : : : : : : : : : : :
entero CGTCACTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAG
      190      200      210      220      230      240
seq5 -----GTCATC-----CCC
      : : : : : : : : : : : :
entero GCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCC
      250      260      270      280      290      300
seq5 70 ACCTTCTCCGGTTTG-----TCACCGCA-----GTCT-----90
      : : : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AGACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGC
      310      320      330      340      350      360
seq5 100 -----CGCTAGAGTGCCCAAC-----TAAA-----110
      : : : : : : : : : : : : : : : :
entero AACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTGTTAGAGAAGAACAA
      370      380      390      400      410      420
seq5 -----TGATGGCAACTAAC-----
      : : : : : : : : : : : :
entero GGATGAGAAGAGAATGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTAC
      430      440      450      460      470      480
seq5 -----AATAAG--GGTTGCGCTCGTTG--CGGGA-----
      : : : : : : : : : : : : : : : :
entero GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAA
      490      500      510      520      530      540
seq5 -----CTTAACCC-----
      : : : : : : : : : : : :
entero GCGAGCGCAGGCGGTTCTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTTAACCGGGGAGGGTC
      550      560      570      580      590      600
seq5 -----
entero ATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGAGAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGA
      610      620      630      640      650      660
seq5 -----AACA-----TCTC-----
      : : : : : : : : : : : :
entero AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTAC
      670      680      690      700      710      720
seq5 -----
entero GCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
      730      740      750      760      770      780
seq5 -----
entero AACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAA
      790      800      810      820      830      840

```



```

Seq6 -----GGCGGT---GTGTACAAGGCCCGGGAA----CGTATTCA
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint TAGCTTGCTACTGATCTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAG
          70      80      90      100     110     120
          80      90      100
Seq6 CCGCGG---CATT-----CTGATCCGCGAT-----TACTAGCGA-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint TGGGGGACAACATTTGAAAGGAATGCTAATACCGCATAACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG
          130     140     150     160     170     180
          110     120     130
Seq6 -----TTCCGACTTC-----ATGGA-----GTCG-----AGTTGCAG-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint GGATCTTCGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTA
          190     200     210     220     230     240
          140     150     160
Seq6 -ACTCCAATCCGGACTACGATC-----GGCTTTTTGAGATT-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint AAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGAC
          250     260     270     280     290     300
          170     180     190     200     210
seq5 -----AGCATCCTATCGCTAGGTAGCAACCCTTTGTACCG-ACCATTGTAGC
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint TGAGACACGGCCCAGACTCCTA-CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGC
          310     320     330     340     350
          220     230
Seq6 A-----CGTGTGT-----AGCCCT---GGCCGTAAGG-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAA
          360     370     380     390     400     410
          240     250
Seq6 GCCATGATGA-----CTTGACGTCGT-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint GCGAGGAGGAGGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAG
          420     430     440     450     460     470
          260     270
Seq6 CCCC GCCTTCCTC-----CAG-----TTTGTC-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint CACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAT
          480     490     500     510     520     530
          280     290     300
Seq6 --ACTGGCAGTA-----TCCTTAA-----AGTTCCCGA-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint TTACTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGCTAATTAAGTCAAATGTGAAATCCCCGAGCTT
          540     550     560     570     580     590
          310
Seq6 -----CATT---ACTCGCTGGC-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint AACTTGGAATTGCATTCGATACTGGTTAGCTAGAGTGTGGGAGAGGATGGTAGAATTCC
          600     610     620     630     640     650
          320     330
Seq6 -----AAATA-----AGGAAAAGGGTTG-----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
acint AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCT
          660     670     680     690     700     710
          340
Seq6 -----CGCT-----
          : : : :
acint GGCCTAACACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
          720     730     740     750     760     770
          350
Seq6 -----CGTTGCGG-----GACTT-----

```



```

aerom  ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
660      670      680      690      700      710
      650
seq7  GAAGGCGGCCCC-----
aerom  ::::::::::::::
720      730      740      750      760      770
seq7  -----
aerom  ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGATTTGGAGGCTGTGTCCCTTGAG
780      790      800      810      820      830
seq7  -----
aerom  ACGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAATCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTA
840      850      860      870      880      890
seq7  -----

aerom  AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGC
900      910      920      930      940      950
seq7  -----

aerom  AACCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGTCTGGAATCCTGTAGAGATACGGGAGTGC
960      970      980      990      1000      1010
seq7  -----
aerom  CTTCCGGAATCAGAACACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTG
1020      1030      1040      1050      1060      1070
seq7  -----
aerom  GGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTTGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAA
1080      1090      1100      1110      1120      1130
seq7  -----
aerom  CTCAAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATG
1140      1150      1160      1170      1180      1190
seq7  -----
aerom  GCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCGTACAGAGGGCTGCAAGCTAG
1200      1210      1220      1230      1240      1250
seq7  -----
aerom  CGATAGTGAGCGAATCCCAAAAAGCGCGTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACT
1260      1270      1280      1290      1300      1310
seq7  -----

aerom  CCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAAATCAGAATGTTGCGGTGAATACGTTCCCGG
1320      1330      1340      1350      1360      1370
seq7  -----
aerom  GCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGATAGCTTA
1380      1390      1400      1410      1420      1430
seq7  -----
aerom  ACCTTCGGGAGGGCGTTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACNNGGT
1440      1450      1460      1470      1480      1490
seq7  -----
aerom  AACCCTAGGGNAACCTGCGGCTGGATCACCTCC
1500      1510      1520      1530

```

Annexe C.4.8 BlastN/Sequence8 vs *Pseudomonas aeruginosa* strain DSM 50071

```

seq8  GW-----
      :
pseud GAACTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCAGCAGGGGCCTTCAACACAT
      10      20      30      40      50      60
seq8  -----GAAGGGAGCTTGCTCCTGGATTC-GCGGCGGACGGGTGAGTAATG

```



```

pseud  TGAGATCTTAGTGGCGCACGTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
      840      850      860      870      880      890
seq8  -----
pseud  GTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTC
      900      910      920      930      940      950
seq8  -----
pseud  GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACATGCTGAGAACTTCCAGAGATGGATT
      960      970      980      990     1000     1010
seq8  -----
pseud  GGTGCCTTCGGGAACAGAGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGA
     1020     1030     1040     1050     1060     1070
seq8  -----
pseud  TGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTG
     1080     1090     1100     1110     1120     1130
seq8  -----
pseud  GGCACCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCAT
     1140     1150     1160     1170     1180     1190
seq8  -----
pseud  CATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAA
     1200     1210     1220     1230     1240     1250
seq8  -----
pseud  GCCGCGAGTGGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTC
     1260     1270     1280     1290     1300     1310
seq8  -----
pseud  GACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTCC
     1320     1330     1340     1350     1360     1370
seq8  -----

pseud  CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAG
     1380     1390     1400     1410     1420     1430
seq8  -----
pseud  TCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA
     1440     1450     1460     1470     1480     1490
seq8  -----
pseud  AGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTCCTTA
     1500     1510     1520     1530

```

Annexe C.4.9 BlastN/Sequence9 vs *Bacillus mojavensis* strain IF015718

```

seq9  -----G
      :
bacil  TCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATG
      10      20      30      40      50      60
      10      20      30      40      50      60
seq9  GGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT
      :
bacil  GGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGT
      70      80      90      100     110     120
      70      80      90      100     110     120
seq9  AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG
      :
bacil  AAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTTGAACCGCATGG
      130     140     150     160     170     180
      130     140     150     160     170     180
seq9  TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
      :
bacil  TTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTA
      190     200     210     220     230     240
      190     200     210     220     230     240
seq9  GTTGGTGAAGTAAAYGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
      :

```

```

bacil  GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
      250      260      270      280      290      300
      250      260      270      280      290      300
seq9   CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
      310      320      330      340      350      360
      310      320      330      340      350      360
seq9   GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTA
      370      380      390      400      410      420
      370      380      390      400      410      420
seq9   AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACC
      430      440      450      460      470      480
      430      440      450      460      470      480
seq9   TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGC
      490      500      510      520      530      540
      490      500      510      520      530      540
seq9   GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAA
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  GTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAA
      550      560      570      580      590      600
      550      560      570      580      590      600
seq9   GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGA-
      ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
bacil  GCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAG
      610      620      630      640      650      660
seq9   -----
bacil  AGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAA
      670      680      690      700      710      720
seq9   -----

bacil  GGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT
      730      740      750      760      770      780
seq9   -----

bacil  AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCC
      790      800      810      820      830      840
seq9   -----
bacil  CTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAA
      850      860      870      880      890      900
seq9   -----

bacil  ACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCA
      910      920      930      940      950      960
seq9   -----
bacil  ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCC
      970      980      990      1000      1010      1020
seq9   -----
bacil  TTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGG
      1030      1040      1050      1060      1070      1080
seq9   -----
bacil  GTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTC
      1090      1100      1110      1120      1130      1140
seq9   -----

```

```

bacil TAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
      1150      1160      1170      1180      1190      1200
seq9 -----
bacil CTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCAAAACCGCGA
      1210      1220      1230      1240      1250      1260
seq9 -----
bacil GGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCG
      1270      1280      1290      1300      1310      1320
seq9 -----
bacil TGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCC
      1330      1340      1350      1360      1370      1380
seq9 -----
bacil TTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACC
      1390      1400      1410      1420      1430      1440
seq9 -----
bacil TTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG
      1450      1460      1470      1480      1490      1500
seq9 -----
bacil CCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA
      1510      1520

```

Annexe C.4.10 BlastN/Sequence10 vs *Stenotrophomonas maltophilia*

```

      10      20      30      40      50
seq10 CT-GATCTGC-GATTACTA-GCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGAC-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  GTCGAACGGCAGCACAGTAAGAGCTTGCT-C TTATGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAG
      10      20      30      40      50
      60
seq10 ---TCCA-----ATC-----CGGAGTGAGA-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  GAATACATCGGAATCTACCTTTTTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCG
      60      70      80      90      100     110
      70
seq10 -----TAGGGT-----TTCTGG-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  CATACGACCTTCGGGTGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCGGATAGATGAGCCGAT
      120     130     140     150     160     170
      80      90      100
seq10 ----GATTGGCTTG-----CCCTCGCGGGTTTG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  GTCGGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTG
      180     190     200     210     220     230
      110     120
seq10 -----CAGCC-----CTCTGTCC-----CTACC-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  AGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
      240     250     260     270     280     290
      130     140     150     160
seq10 -----ATTGTAGTACGTGTGTAGCCCTGGTC-----GTAAGGGCCATGATGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  TGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATAACCGGTGGGTGAAGAAG
      300     310     320     330     340     350
      170     180     190     200
seq10 C-TTGACGTCATCCCCACCTT-----CCTCCGGTTTGTACCGG-----
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
steno  CCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAAAGCAGTCGGCTAATACCCGGTTGT
      360     370     380     390     400     410
      210     220     230     240
seq10 -----CGGTCTCCTTAGAGTTCCACC-----ATTACGTGCTGGCA-----ACT

```



```

steno  CGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTACTACAATGGTAGGGACAG
        1140      1150      1160      1170      1180      1190
                                690
seq10  CGGG-----AATTCCACTACCC-----
        :::                               :::  :::  :  ::
steno  AGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCAGTCCGGATTGGA
        1200      1210      1220      1230      1240      1250
        700      710      720      730      740
seq10  -TCTACCAC---ACTCTA---GTCGC-----CCAGTATCCACTG--CA--ATTCCCAGG
        ::: :  ::  :::: :  ::::  :  ::::  :  :  :  ::  :::: :  :
steno  GTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCG
        1260      1270      1280      1290      1300      1310
        750      760      770      780
seq10  TTGAG-----CCCAGGGCTTTCACA-ACAGACTTAAACAAC-----CACC
        :::       :::  ::  :::  :::  ::  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :  :
steno  GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCCGTCACACCATGGGAGTTTGTTCACC
        1320      1330      1340      1350      1360      1370
seq10  T-ACGCACG---C
        :  :::  :  :
steno  AGAAGCAGGTAGC
        1380

```

Curriculum Vitae

Nom : BOUBENDIR

Prénom : Abdelhafid

Date de naissance : 22/01/1978

Etat Matrimonial: Marié

Structure de rattachement actuel: Centre Universitaire de Mila, Faculté des Sciences et Technologies, Département des Sciences de la Nature et de la Vie.

Adresse personnelle: Chez Boulakroun Mohamed El-Safsafa Grarem W. Mila. 43100. Algérie

N°Tel : 07.90.72.32.69

Email : a.hafid.bio@gmail.com

Activités administratives

-Membre du comité scientifique du département des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mohamed Khider, Biskra, de 2007 à 2011.

-Membre du conseil scientifique de la Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mohamed Khider, Biskra, les années 2010 et 2011.

-Organisation des portes ouvertes sur le département des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mohamed Khider, Biskra, les années 2010 et 2011.

-Adjoint chef département chargé de la poste graduation et de la recherche scientifique au département des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mohamed Khider, Biskra (2009-2010).

-Chef de la spécialité Microbiologie fondamentale et Appliquée au département des Sciences de la Nature et de la Vie à l'université Mohamed Khider Biskra, les années 2010 et 2011.

-Chef de Département des Sciences de la Nature et de la Vie au Centre Universitaire de Mila 2011-2012.

Activités scientifiques:

1. Incidence de *Listeria spp.* et autres bactéries psychrotrophes dans le lait cru bovin dans le Nord-Est algérien. *Revue de Médecine Vétérinaire* 2011, **ISSN:** 00351555.
2. Incidence de *Listeria spp.* et des bactéries psychrotrophes dans le lait cru dans le semi-aride et le Nord-Est algériens. Les XVIèmes Journées Nationales de Microbiologie. Société Algérienne de Microbiologie. **CHLEF**. 27-28 octobre 2010.
3. Caractérisation phénotypique et génotypique de *Listeria sp.* et autres genres bactériens isolés du lait cru bovin récolté dans le nord-est et le semi-aride algériens. Congrès International. Biotechnologie microbienne au service du développement. **Marrakech, MAROC**. 02-05 Novembre 2009.

4. Caractérisation phénotypique et géotypique de *Listeria spp.* et autres genres bactériens isolés du lait cru bovin récolté dans le Nord-Est et le semi-aride algériens. 4èmes journées de Biologie. **Boumerdes**, 23-24 Mai 2009.
5. Caractérisation phénotypique et géotypique de *Listeria spp.* et autres bactéries pathogènes isolées du lait cru récolté dans le Nord-Est et le semi-aride algériens. Séminaire International de Biochimie et Biologie Moléculaire. **Université Mentouri-Constantine**. 13-14 Octobre 2009.
6. Isolement et caractérisation culturelle de *Listeria spp.* à partir d'un lait cru récolté de la région de Biskra. Les 1ères Journées Algéro-Tunisiennes de Microbiologie. **Tébessa**. 18-19 Mai 2008.

Stages :

-Laboratoire d'Hygiène de Mila (2007, 2008 et 2009) : Analyse bactériologique du lait.

-Laboratoire de Biotechnologie Microbienne, Université Sidi Mohamed Ben Abdullah, U.S.M.B.A, Fès, Maroc, les années 2008, 2009 et 2010 : PCR et Electrophorèse.

-Centre Universitaire Régional d'Interface (C.U.R.I), Fès, Maroc, les années 2008, 2009 et 2010: PCR, Electrophorèse, séquençage et analyse bio-informatique (GenBank et BLASTN).

-Laboratoire de Microbiologie Alimentaire, Département des Sciences Alimentaires, Faculté d'Agriculture, Université de Bologne, Italie (2011) : PCR-RADP, DGGE, PCR et séquençage de l'ARN 16S.

Activités pédagogiques

Enseignements des matières suivantes :

Microbiologie Alimentaire

Génétique Microbienne

Biochimie Microbienne

Microbiologie Générale

Lexique phylogénétique

Ancêtre : Il s'agit d'un organisme hypothétique qui possède des caractères dans son état primitif. Sur un arbre phylogénétique, il se situe donc au niveau d'un noeud, et non sur une branche terminale.

Apomorphe : se dit d'un état de caractère quand celui-ci est dérivé, c'est-à-dire évolué par rapport à l'état **plésiomorphe** (ou primitif). C'est une notion relative, pas absolue; c'est-à-dire qu'un état de caractère ne peut être apomorphe (ou plésiomorphe) que par rapport à un autre état.

Caractère: un caractère peut être tout attribut utilisé pour reconnaître, décrire, définir ou différencier les taxons. Il se divise en au moins en deux états : primitif (**plésiomorphe**) ou dérivé (**apomorphe**).

Clade: Vient du grec *clados* qui signifie branche. Taxon strictement monophylétique, c'est-à-dire contenant un ancêtre et tous ses descendants.

Cladistique : Méthode d'analyse des caractères qui vise à mettre en évidence la séquence évolutive de leurs transformations, c'est-à-dire déterminer leur état plésiomorphe (primitif) et leur(s) état(s) apomorphe(s) (dérivés).

Distances (méthode de) : Analyse de caractères qui, au lieu de déterminer les séquences de transformation évolutive de chacun d'entre eux, mesure le degré de différence global entre deux ensembles de caractères (donc entre deux taxons) par une variable continue unique, la "distance". Il y a donc une valeur de distance pour chaque couple de taxons dans l'analyse, elles sont inscrites dans une matrice. L'arbre tiré de cette matrice sera appelé phénogramme car fondé sur des mesures de similitude globale entre taxons.

Extra groupe : On dit aussi groupe extérieur ou encore "outgroup" tiré de l'anglais. Groupe que l'on sait *a priori* placer en dehors d'un ensemble de taxons dont on cherche les relations de parenté.

Feuille : représente le taxon terminal dans un arbre ou unité évolutive.

Matrice (de distances): Tableau à double entrée comprenant verticalement une série d'espèces ou de taxons, et horizontalement cette même série. Dans chacune de ses cases, le tableau contient la distance (un chiffre) qui sépare les deux espèces concernées.

Monophylétique (groupe): groupe qui comprend une espèce ancestrale et tous ses descendants.

Neighbor-Joining : Nom d'une méthode de construction d'arbres à partir d'une matrice de distances, inventée par Saitou et Nei en 1987. Lorsqu'elle procède à la construction d'un arbre, cette méthode de distances a ceci de particulier qu'elle agglomère les espèces dans un ordre tel que la longueur totale de l'arbre est minimisée. C'est la méthode utilisée dans le logiciel "Evolution Moléculaire".

Noeud : Point de rencontre de trois branches ou segments de branches dans un arbre. Il constitue généralement des taxons ou des unités évolutives hypothétiques (UEH).

Parcimonie (méthode de) : Méthode de construction de phylogénies qui, parmi tous les dendrogrammes possibles, retient celui qui fait appel au plus petit nombre nécessaire d'évènements évolutifs, c'est à dire de changements d'états des caractères.

Paraphylétique (groupe): groupe qui comprend une espèce ancestrale, et une partie seulement de ses descendants.

Phénétiqque:

- Synonyme de taxonomie numérique, système où les taxons sont identifiés et rangés sur la base de la similitude globale. La signification évolutive des caractères n'est pas utilisée. Les caractères eux-mêmes ne sont pas polarisés, c'est-à-dire codés en états apomorphes ou plésiomorphes. Les différences entre tous les caractères de deux taxons sont mesurées globalement à l'aide d'une variable continue (similitude globale) qui est une distance entre les taxons. On inscrit dans une matrice chaque distance pour chaque couple de taxons, une classification est construite à partir de ces données.
- Se dit d'une classification construite à partir de méthode de taxonomie numérique.

Phylogénie : Le cours historique de la descendance des êtres organisés. Elle se base sur le concept de descendance (des espèces) avec modification.

Plésiomorphe: opposé à **apomorphe**. Un état de caractère est dit plésiomorphe (ancien) par rapport à un état plus dérivé. C'est une notion relative, pas absolue.

Racine : Segment de branche en amont du noeud du rang le plus important, définissant le groupe extérieur. En d'autres termes, c'est la position dans l'arbre du groupe extérieur. En même temps, elle définit le taxon in-group. La racine peut être considérée comme un point de référence pour l'interprétation des caractères : les états de caractères de l'extra-groupe sont des états plésiomorphes, les états qui en diffèrent sont apomorphes. Remarque : Pour pouvoir comparer aisément deux arbres, il faut les enraciner chacun sur la même espèce ou sur le même taxon.

Synapomorphie [étymologiquement : caractères dérivés partagés]: ensemble de caractères dans leur état dérivé définissant un clade (unité monophylétique).

Taxon : unité de classement utilisée en systématique. Les taxons sont une espèce, un genre, une famille, un ordre, une classe, etc.

Taxonomie (ou Taxinomie) : Science qui a pour objet la classification des êtres vivants, leur identification et leur nomenclature. Elle permet de classer les organismes en groupe d'affinité ou taxons.

U.P.G.M.A. (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average). Méthode phénétique de construction d'arbres à partir d'une matrice de distances. Elle consiste à assembler les espèces ou taxons les plus proches dans un premier temps. Les distances de ces espèces aux autres taxons sont moyennées afin d'obtenir une distance globale du nouvel ensemble formé par ces deux espèces vis à vis de chaque autre taxon. Parmi ceux-ci, celui dont la distance (par rapport à l'ensemble formé par les deux premières espèces) est la plus faible est agglomérée à son tour. De proche en proche, par moyennes successives, toutes les espèces (ou taxons) sont intégrées une à une dans l'arbre.