

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 de biochimie et microbiologie

N° d'ordre : 003/Mag/2011

N° de série: 003/Mag/2011

MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de Magistère

Spécialité : Ecologie Microbienne

Par M^{elle} : KAOUACHE Saliha

**Evaluation et taxonomie numérique de la flore
Listeria spp. Dans un environnement d'élevage
bovin**

Soutenue le : 19/ 01/2010

Devant le jury :

Président :	Benguedouar A. Professeur	Université Mentouri Constantine
Rapporteur :	Hamidechi M. A. Maitre de conférences	Université Mentouri Constantine
Examineurs :	Boudemagh A. Maitre de conférences	Université Mentouri Constantine
	Kitouni M. Maitre de conférences	Université Mentouri Constantine
	Benhizia Y. Maitre de conférences	Université Mentouri Constantine

Année Universitaire : 2010-2011

Remerciements

Au terme de ce travail de mémoire de Magistère, les mots justes sont difficiles à trouver pour exprimer mes remerciements.

Parmi tous ceux qui ont contribué à l'accomplissement de ce mémoire, je rends un vibrant hommage aux membres du jury de ce mémoire qui ont accepté de superviser ce travail.

Un tout grand Merci au Professeur A. BENGUEDOUAR, responsable de cette filière de Magistère (Ecologie microbienne) pour avoir accepté de présider ce jury.

Un Merci particulier aux examinateurs de ce mémoire ; à savoir les Docteurs et Maîtres de Conférences Messieurs A. BOUDEMAGH, M. KITOUNI et Y. BENHIZIA tous de l'université Mentouri Constantine.

Un Merci particulier à mon Directeur de travail, le Docteur M. A. HAMIDECHI qui a suivi et dirigé ce mémoire.

Enfin, j'exprime ma profonde reconnaissance à tous mes enseignants de graduation et de Post-graduation principalement pour le savoir qui m'a été transmis le long de mon parcours d'apprentissage au sein de la faculté SNV ; ainsi que les personnes m'ayant assuré la partie pratique au laboratoire de microbiologie au Département de Biochimie-Microbiologie.

Table des matières

Introduction	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 1: Biologie des <i>Listeria</i>	
1. Position taxonomique	3
2. Morphologie	5
3. Caractères cultureux.....	5
4. Physiologie.....	6
5. Biochimie.....	8
6. Listériose	15
6. 1. Listériose humaine	15
6. 2. Listériose animale.....	16
7. Ecologie	16
7. 1. <i>Listeria</i> et lait cru	17
7. 2. Origine de la contamination du lait cru.....	18
Chapitre 2: Taxonomie numérique	
1. Définition.....	20
2. Démarche de la taxonomie numérique.....	21
3. Méthode de construction des arbres.....	22
3.1. La méthode Unweight Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)	22
3.1.1. Les étapes de la méthode UPGMA.....	22
3.2. La méthode Neighbor Joining (NJ)	23
3.2.1. Les étapes de la méthode NJ.....	23

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel	24
1.1. Origine et prélèvements des échantillons de lait cru	24
2. Méthodes.....	24
2. 1. Analyse bactériologique.....	24
2.1.1. Evaluation de la Flore Totale Aérobie Mésophile(FTAM)....	24
2.1.1.1. Préparation des échantillons	24
2.1.1.2. Dénombrement de la FTAM.....	24
2.2.2. Recherche de <i>Listeria spp.</i> dans le lait cru.....	25
2. 2.2.1. Enrichissement	26
2.2.2.2. Isolement	26
2.2. Tests d'identification.....	30
2.3.1. Tests Préliminaires	30
2.3.2. Tests physiologiques.....	30
2.3.3. Tests biochimiques.....	30
2.3.4. Milieux sélectifs et conservation des souches.....	31
2.3. Analyse phylogénétique.....	31
2.3.1. Calcul du coefficient de Jaccard et matrice de distance	31
2.3.2. Reconstruction de l'arbre phylogénétique.....	32
2. 4. Analyse factorielle des correspondances (AFC).....	32

Résultats et discussion

1. Résultats.....	33
1.1. Analyse bactériologique	33
1.1.1. Evaluation de la FTAM	33
1.1.1.1. Dénombrement de La FTAM	33
1.1.1.2. Aspect des colonies.....	33
1.1.2. Recherche de <i>Listeria spp.</i>	33
1.2. Identification des isolats.....	40
1.3. Analyse phylogénétique	44
1.4. AFC	53
2. Discussion.....	54
Conclusion et perspectives	58
Références bibliographiques	60
Annexes	
Lexique phylogénétique	

Liste des tableaux

Numéro	Intitulé	Page
Tableau 1	Effet de la température sur le temps de génération de <i>Listeria monocytogens</i>	6
Tableau 2	<i>cultivée sur le lait cru</i> Croissance de <i>Listeria monocytogens</i> en milieu T S AY E	7
Tableau 3	Limite pour la croissance pour <i>Listeria monocytogens</i>	7
Tableau 4	Principaux caractères biochimiques du genre <i>Listeria</i>	8
Tableau 5	Caractéristiques des différentes espèces de <i>Listeria</i>	9
Tableau 6	Caractères différentiels de <i>Listeria</i> et les bactéries proches	12
Tableau 7	Caractères antigéniques des sérovars de <i>Listeria</i>	14
Tableau 8	Fréquence de contamination du lait cru de vaches par <i>Listeria monocytogens</i>	18
Tableau 9	Calcul du coefficient de Jaccard entre deux souches A et B	21
Tableau 10	Distribution des échantillons de lait par ferme	24
Tableau 11	Codage des états des caractères	31
Tableau 12	Dénombrement de la FTAM des échantillons de Constantine (10^3 UFC/ml)	34
Tableau 13	Dénombrement de la FTAM des échantillons de Mila (10^3 UFC/ml)	35
Tableau 14	Résultats des examens macroscopique et microscopique des isolats de Constantine	37
Tableau 15	Résultats des examens macroscopique et microscopique des isolats de Mila	39
Tableau 16 a	Matrice binaire des caractères morphologiques et physiologique des isolats	41
Tableau 16 b	Matrice binaire des caractères biochimiques des isolats	42
Tableau 17	Identification présomptive des souches	43
Tableau 18	Matrice binaire des souches à Gram positif	45
Tableau 19	Matrice de distance des souches à Gram positif	46
Tableau 20	Matrice binaire des souches à Gram négatif	51
Tableau 21	Matrice de distance des souches à Gram négatif	51

Liste des figures

Numéro	Intitulé	Page
Figure 1	Evolution de la taxonomie des <i>Listeria</i> (Bind, 1990).	4
Figure 2	Position systématique de <i>Listeria</i> (Garrity <i>et al</i> , 2005).	4
Figure 3	Interrelations écologiques de <i>L. monocytogenes</i> , de l'environnement, des aliments et les causes de la listériose (Wagner, 2008).	17
Figure 5	Cycle de contamination du lait (Lebres, 2006).	19
Figure 6	Arbre phylogénétique des souches à Gram positif construit selon la	47
Figure 7	Arbre phylogénétique des souches à Gram positif construit selon la	48
Figure 8	Arbre phylogénétique des souches à Gram négatif construit selon la	52
Figure 9	Arbre phylogénétique des souches à Gram négatif construit selon la	52
Figure 9	Inter corrélation entre les deux algorithmes utilisés et la coloration de Gram.	53

Liste des organigrammes

Numéro	Intitulé	Page
Organigramme 1	Clé dichotomique pour la distinction des espèces du genre <i>Listeria</i> (Rocourt 2000).	10
Organigramme 2	Clé dichotomique pour l'identification des <i>Listeria spp.</i> (Larpent, 2004).	11
Organigramme 3	Clé dichotomique pour l'identification des <i>Listeria spp.</i> (Gorski, 2008).	12
Organigramme 4	Etapas pour l'évaluation de la FTAM	25
Organigramme 5	Etapas pour l'isolement et l'identification de <i>Listeria spp.</i> dans le lait cru	27
Organigramme 6	Mode opératoire pour l'isolement et l'identification de <i>Listeria spp.</i> sur gélose au sang cuit additionnée de céfazoline	28
Organigramme 7	Mode opératoire pour l'isolement et l'identification de <i>Listeria spp.</i> sur gélose Oxford et gélose Columbia	29

Liste des abréviations

ADH:	Arginine- déshydrolyse
AFC :	Analyse Factorielle des correspondances
ARA:	Arabinose
CEL:	Cellobiose
CIT:	Citrate
DUL	Dulcitol
ESC:	Esculine
FRU:	Fructose
FTAM :	Flore Totale Aérobie Mésophile
GLY:	Glycérol
GN:	Gélose Nutritive
IND:	Indole
JORADP	Journal Officiel de la République Algérienne
LAC:	Lactose
LDC:	Lysine Décarboxylase
MAL	Maltose
MAN:	Mannitol
MAn:	Mannose
MEGA:	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MEL	Mélibiose
MH:	Muller Hinton
NJ:	Neighbor- Joining
ODC:	Ornithine- décarboxylase
ONPG:	Ortho- Nitro- Phényl- beta- Galactosidase
OTU:	Operational Taxonomic Unite
RAF:	Raffinose

RHA: Rhamnose
RIB: Ribose
RM: Rouge de Methylene
SAC: Saccharose
SAL: Salicine
SOR: Sorbitol
TRE: Trehalose
TSI: Tri Sugar Iron
TSAYE : Tryptone Soya Yeast Extract Agar
UFT: Unité Formante Colonie
UPGMA: Unweight Pair Group Methode with Arithmetic mean
XYL: Xylose

Introduction

Introduction

En termes de santé publique, l'écologie microbienne et sa pratique analytique sont devenues des concepts qui englobent la sécurité alimentaire des individus par des moyens de prévention d'analyse du risque. Cette préoccupation est même concrétisée à l'échelle administrative par l'apparition de plusieurs articles du journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire (JORADP N° 35).

Comparé à d'autres pays, l'analyse du risque de l'environnement microbien en Algérie sur l'individu est particulièrement axée sur des travaux scientifiques qui ont concerné la totalité de la flore microbienne dans un environnement donné. Cependant, la situation dans les autres pays est différente. En effet, aux Etats-Unis, 12 % des échantillons de laits crus sont contrôlés positifs concernant la présence de *Listeria monocytogenes* et 4% en France. En Allemagne, 17,6% des échantillons de végétaux crus contiennent *L. monocytogenes*. Au Danemark, l'analyse microbiologique des viandes (bœuf en tranche) a montré que 26% des échantillons contenaient *L. monocytogenes*.

Dans ce même contexte, la microbio-surveillance environnementale est devenue un recours obligatoire et constitue un défi écologique.

La listériose supposée un évènement rare peut avoir des conséquences notables aux niveaux agronomique, alimentaire et économique ; cependant, elle reste à l'écart de l'épidémiologie-surveillance bien que le JORADP exige la recherche du germe en cause : *Listeria monocytogenes* en l'occurrence.

En Europe et aux Etats-Unis des épidémies de listérioses ont été observées : en Allemagne (Halle : 1949-1957) 100 cas ont été causés par *L. monocytogenes* après consommation de lait cru. Au Massachussets (Etats –Unis : 1979) 20 cas de listériose étaient due à la consommation des végétaux et de lait crus. En Illinois (Etats –Unis : 1994), 48 cas de listériose étaient dus suite à une consommation de lait chocolaté.

C'est par rapport à cette optique bactério-écologique que nous avons choisi comme exemple d'analyse et de microbio-surveillance, un environnement particulier très favorable au développement de *L. monocytogenes* : le lait cru de vaches.

Dans le cadre de la réalisation pratique de ce travail nous nous sommes intéressés à deux régions (Constantine et Mila) pour réaliser les prélèvements de laits crus. Ceux-ci seront à la base des objectifs suivants :

- 1- Apprécier la qualité bactérienne de laits crus par l'isolement et l'identification de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM),
- 2- Isoler et identifier *L. monocytogenes* et les autres *Listeria spp.*,
- 3- Déterminer l'interaction *Listeria monocytogenes* / flore du lait grâce à une analyse phylogénétique par taxonomie numérique corroborée par une analyse factorielle des correspondances.

Synthèse bibliographique

Chapitre 1: Biologie des *Listeria*

1. Position taxonomique

L.monocytogenes (initialement appelée *Bacterium monocytogenes*) a été décrite en premier en 1926 à Cambridge, Angleterre, comme étant la cause d'infection à monocytose, au laboratoire rodents (Murray, 1926). L'année suivant, Pirie isolat lui aussi une bactérie à Gram positif, en Afrique du sud, à partir de gerbils sauvages infectés et proposa le nom de *Listerella* pour le genre en honneur au chirurgien "Lord Lister".

Murray et Pirie réalisèrent qu'ils ont procédé à l'isolement de la même espèce bactérienne et ainsi ils combinèrent les noms pour former *Listerella monocytogenes*. Celui-ci a du être changé pour des raisons de taxonomie en *Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940).

Le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique des *Clostridium*, voisin des genres *Brochothrix*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus* (Holt *et al.*, 1994; Avril *et al.*, 2000).

Depuis la première description de *Listeria* en 1926, la littérature a mentionné huit espèces :

- *L. monocytogenes* en 1926.
- *L. denitrificans* en 1948.
- *L. grayi* en 1966.
- *L. murrayi* en 1971.
- *L. innocua* en 1981.
- *L. welshimeri* et *L. seeligeri* en 1983.
- *L. ivanovii subsp. Ivanovii* en 1985, *L. ivanovii subsp. Londoniensesis* en 1992.

Deux sont pathogènes : *Listeria ivanovii* et *Listeria monocytogenes* (Farber et Peterkin,1991; Berche *et al.*, 2000 ; Rocourt *et al.*, 2003 ; Larpent, 2004 ; Le Mennier et Leclercq, 2009).

L'évolution de la taxonomie des *Listeria* (Figure1) a démontré que ce genre est constitué de deux branches distinctes (Larpent, 2004) :

- 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*.

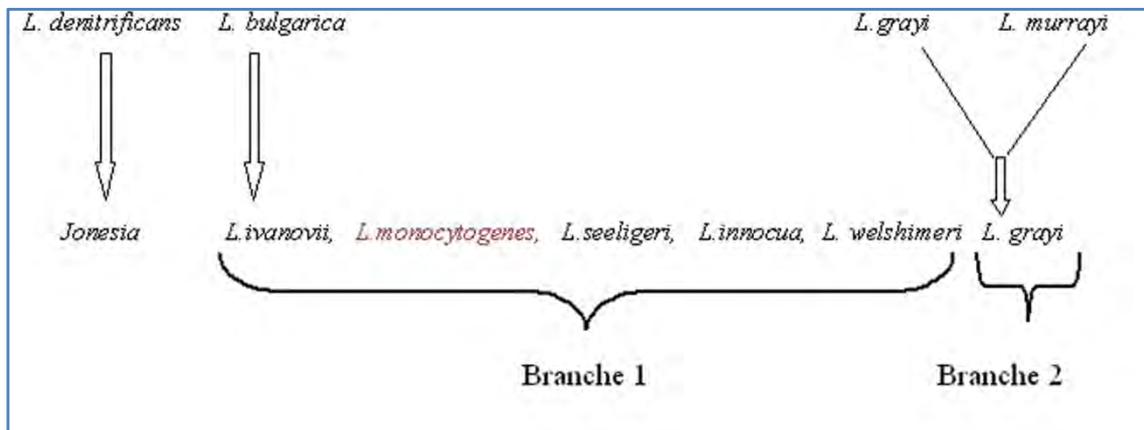


Figure 1 : Evolution de la taxonomie des *Listeria* (Bind, 1990)

La classification hiérarchique du genre *Listeria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADN 16S est représentée sur la figure suivante:

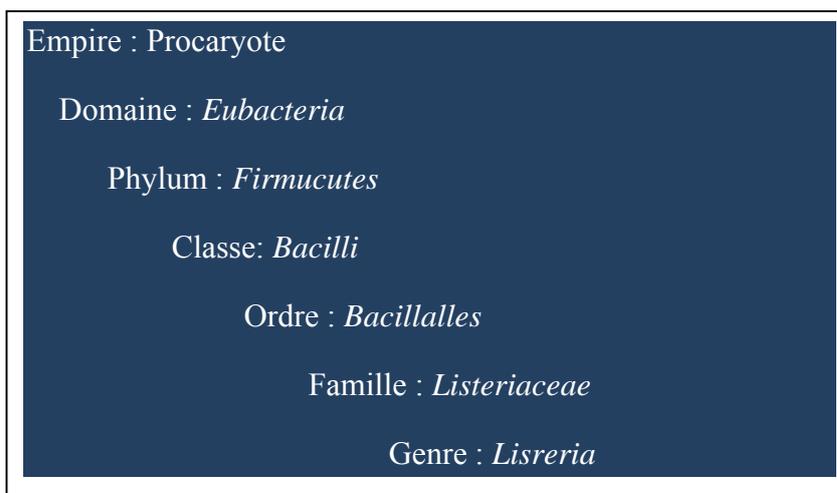


Figure 2 : Position systématique de *Listeria* (Garrity *et al.*, 2007).

2. Morphologie

Listeria spp. est un petit bacille à Gram positif, régulier, non sporulant, de 0,4 à 0,5 Mm de diamètre sur 0,5 à 2 Mm de longueur, aux extrémités arrondies, quelques cellules peuvent être incurvées. Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînes, elles font parfois des angles V entre elles, non acido- alcool résistants, non capsulées, aérobies anaérobies facultatifs.

Peu ou pas mobiles à 37° C, *Listeria* est toujours mobile à 22- 25° C. Cette particularité est un caractère important dans le diagnostic bactériologique. La ciliature est de type péritriche, avec un nombre de flagelles compris entre 1-5 et la mobilité est caractéristique car la bactérie semble tourner sur elle-même.

Cette mobilité à 22° C permet également de différencier *Listeria* des bactéries immobiles comme *Erysiplothrrix* et la plupart des *Corynebacterium* (Euzeby, 2000 ; Rocourt, 2000; Larpent, 2004).

3. Caractères culturels

Les *Listeria* se développent bien sur les milieux usuels. Leur croissance est favorisée par l'addition de glucose à la concentration de 0,5 % ou l'utilisation de milieux à base de tryptose (Lucht, 1996; Rocourt, 2002; Larpent, 2004).

Sur gélose nutritive, les colonies de 24-48h à 37°C ont un diamètre de 0,5 à 1,5 mm, sont arrondies, lisses à bords régulières et transparentes. Elles apparaissent gris bleuté par illumination normale. La colonie, parfois gluante, s'émulsifie facilement et peut laisser une trace sur la gélose.

Sur gélose au sang, quelques espèces sont bêta- hémolytiques. La mise en évidence de ce caractère est importante car elle permet de faire la différence entre les espèces et de faire la distinction entre les souches non hémolytiques, donc non virulentes. Dans le cas équivoque, nous aurons recours au test de Camp, qui permet de confirmer ou d'infirmer l'hémolyse (Frevacque, 1999; Euzeby, 2000; Rocourt, 2002).

En bouillon glucosé, un trouble intense et homogène apparaît en 18 heures. Dans Les vieilles cultures, les colonies s'élargissent et s'opacifier, les colonies de forme « rough » sont plus larges plates et ternes.

4. Physiologie : Relativement, les *Listeria spp.* ne sont pas exigeantes au point de vue nutritionnel et requièrent, généralement, la biotine, la riboflavine, la thiamine et les acides aminés (cystéine, glutamine, isoleucine, leucine et valine) pour leur croissance optimale.

4.1. Température

Listeria se développe à des températures allant de 1 à 45°C. C'est un germe psychrotrophe, il a la faculté de se développer à une température égale ou inférieure à 7°C. La température optimale de la croissance est de 30 à 37°C (George *et al.*, 1988; Holt *et al.*, 1994 ; Larpent, 2004 ; Chaturongakul et boor, 2006 ; kim *et al.*, 2008 ; Vanegas *et al.*, 2009).

La croissance à 4°C est une particularité exceptionnelle de *Listeria*. Cette caractéristique est utilisée comme méthode d'enrichissement pour les produits contaminés ou pluri-microbiens (Farber et Peterkin, 1991 ; Konvincic *et al.*, 1991 ; Berche *et al.*, 2000 ; Linton *et al.*, 2008 ; Le Mennier et Leclercq, 2009).

Listeria n'est pas considérée comme un germe thermorésistant. Elle est rapidement détruite à 60°C. Cependant, un traitement thermique tend à affaiblir la bactérie qui devient alors plus sensible aux autres facteurs agressifs.

Tableau 1 : Effet de la température sur le temps de génération de *L.monocytogenes* cultivée sur lait cru (Larpent, 2004)

Température (°C)	4	8	13	21	35
Temps de génération (h)	33,27	13,06	5,82	1,86	0,692

L.monocytogenes

peut survivre de 30- 40 secondes à 65°C, 10 secondes à 75°C et une seconde à 85°C (Larpent, 2004). De plus, une température de 71,7°C est requise pour une pasteurisation du lait entier ou écrémé afin d'éliminer *L.monocytogenes* (Larpent, 2004). En fin l'équation de la thermorésistance de *Listeria* est :

$$\text{Log}(D) = 11,7213 - 0,1924(T)$$

4. 2. Activité d'eau (A_w)

Listeria se développe à un optimum de A_w= 0,97, mais elle peut se développer à 0,943. Un A_w inférieure à 0,939 ne semble pas permettre la croissance. La bactérie reste viable plusieurs jours pour des valeurs d'A_w plus faibles.

4. 3. Sels

Listeria peut se développer sur des milieux contenant jusqu'à 10% de chlorure de sodium. Sa croissance n'est pas inhibée par le thiocyanate de potassium. Elle peut croître sur gélose Mac Conkey en présence de 0,25% d'acétate de thallium, de 3,75% de thiocyanate de potassium, de 0,04% de tellurite de potassium, de 0,01% de chlorure (Frevacque, 1999).

4. 4. pH

Listeria spp. peut se développer dans une plage de pH variant de 5,6 à 9,6. Son pH optimal est voisin de 7 avec une tendance plutôt alcalin. Des études ont, néanmoins, montre que *Listeria monocytogenes* se développe à des pH inférieurs à 5, mais la tolérance à ces pH est plus faible qu'aux pH basiques. (Larpen, 2004). Ainsi, le minimum de pH exigé pour la croissance des *Listeria* se situe bien au-dessous de 5,6 (tableaux 2 et 3).cette réaction dépend cependant de la température d'incubation : à 4°C et pH 5,0, les populations diminuent d'une puissance, après 67 jours de stockage, à 13° C au même pH, la population atteint 10^8 UFC/ ml.

Tableau 2 : Croissance de *L. monocytogenes* en milieu T SYEA (George *et al.*, 1988).

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

Tableau 3: Limites pour la croissance pour *L. monocytogenes* (Larpen, 2004).

	Minimum	Optimum	Maximum
T (C°)	-0,4	37,0	45,0
pH	4,39	7,0	9,4

5. Biochimie

Les principaux caractères biochimiques communs au genre *Listeria* sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4: principaux caractères biochimiques du genre *Listeria* (Larpen, 2004)

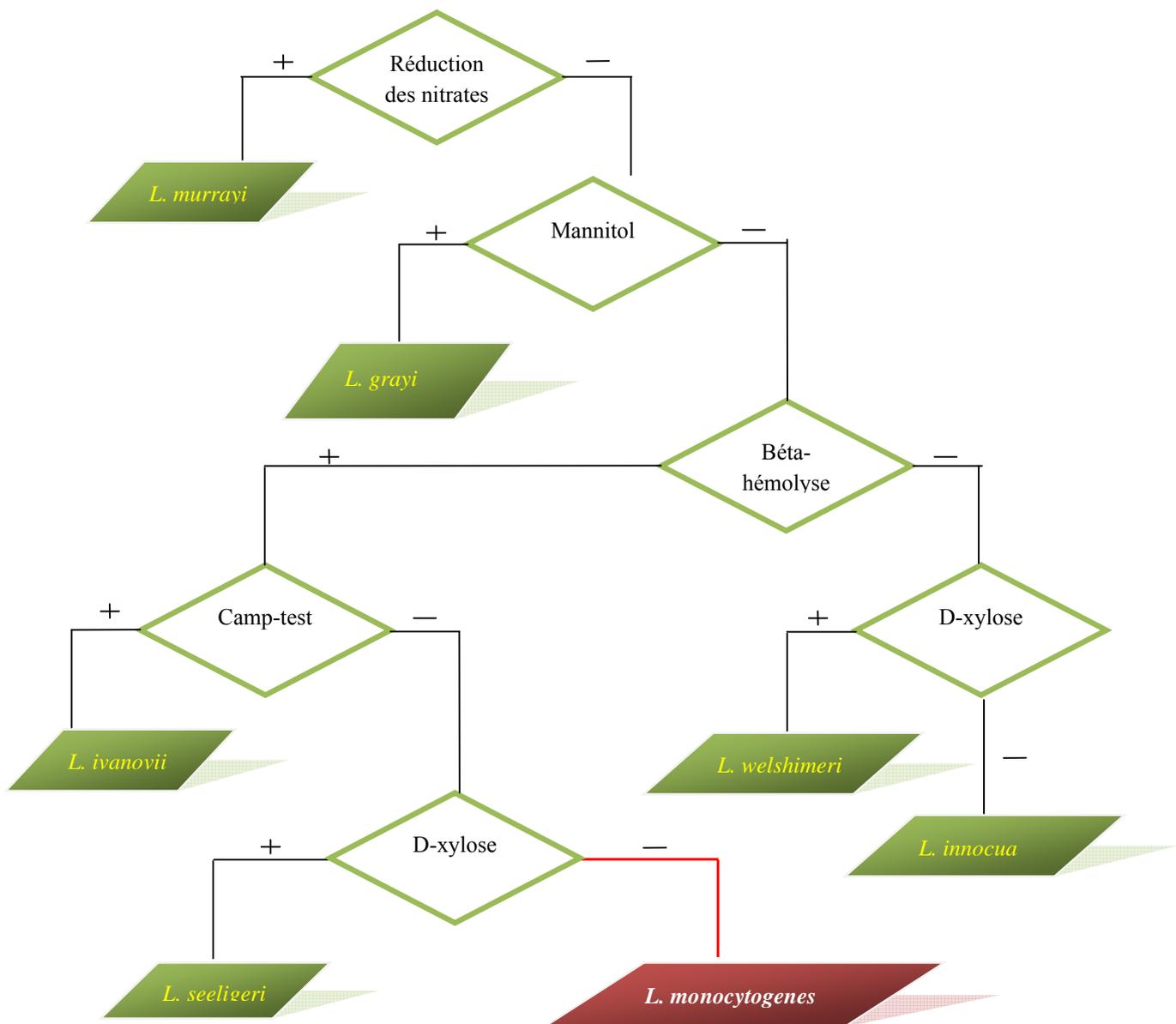
Réactions positives	Réaction négatives
Catalase	Oxydase
VP, RM	Gaz en Glucose
Esculine	Uréase
Type respiratoire: aéro-anaérobie	Indole
Réduction du lait tournesolé	Gélatinase, H ₂ S

Les caractéristiques des différentes espèces du genre *Listeria* figurent dans le tableau 5.

Tableau 5 : caractères biochimiques différentiels des espèces de *Listeria* (Larpent, 2004).

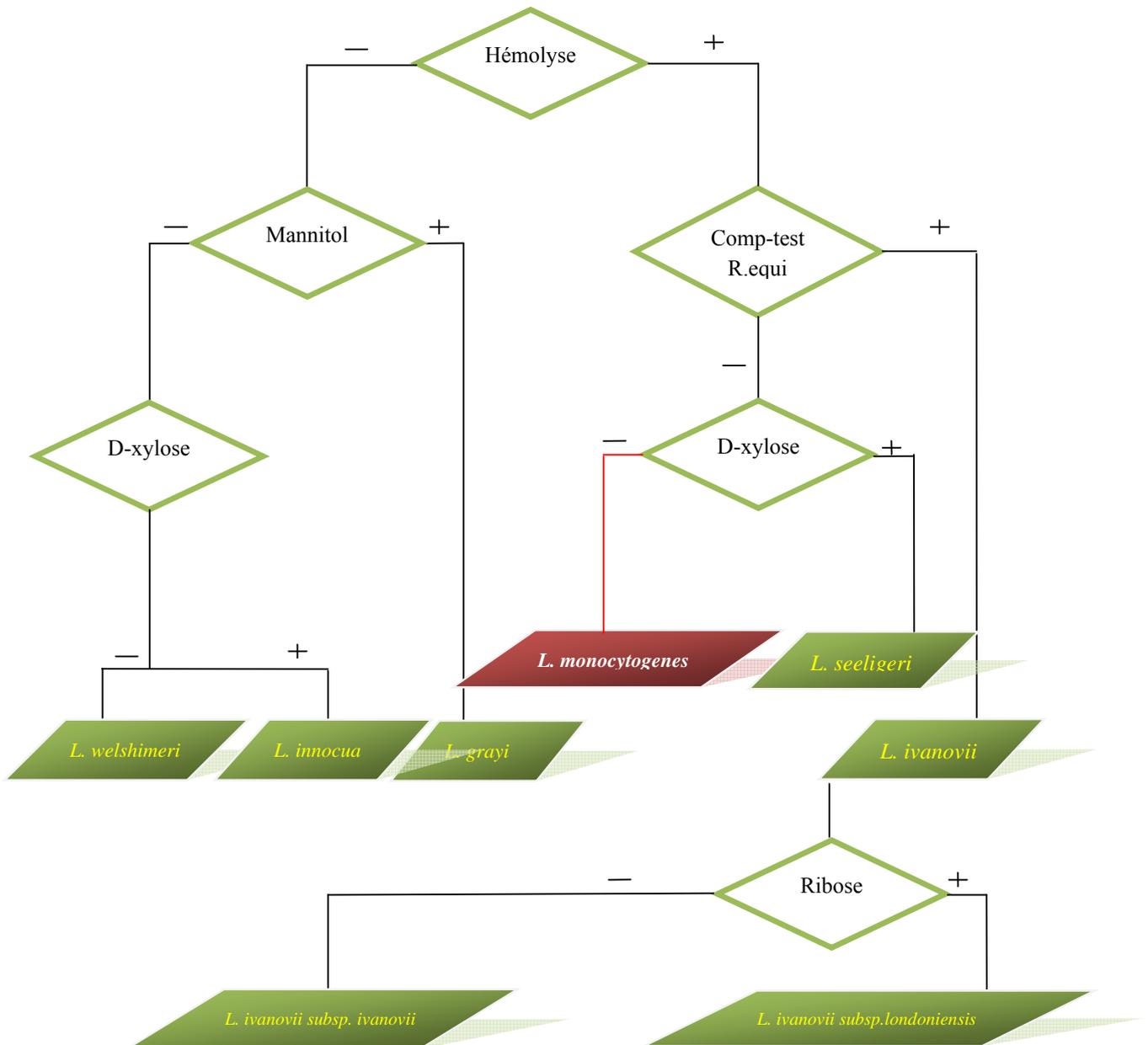
caractéristiques	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshemeri</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.grayi</i>
Bâtonnets irréguliers	-	-	-	-	-	-
B-hémolyse	+	-	+	-	+	-
Camp-test						
- <i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	+	-	-	-
- <i>Rhodococcus equis</i>	-	-	-	-	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
L- arabinose	-	-			-	-
Dextrine	±	-			-	+
Galactose	±	-			±	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+
Glycogène	-	-			-	-
Lactose	±	+	+		+	+
D-Lyxose	-	-			-	+
Mannitol	-	-	-	-	-	+
Mélézitose	±	+	±	±	±	-
Mélibiose	-	-			±	-
α-Méthyl-D-glucoside	+	+	-	±	+	+
α-Méthyl-D-mannoside	+	+	-	+	+	
L-Rhamnose	+	±	-	±	-	-
Sorbitol	±	-			-	-
Amidon soluble	-	-	-	-	-	+
Saccharose	-	±			±	-
D-xylose	-	-	+	+	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	+
D-tagatose	±	±	±	±	-	-
D-turanose	±	±	±	±	±	-
Voges-proskauer	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de :						
Urée	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-			-	-
Hippurate	+	+	±	±	+	-
Amidion	±	±			-	-
esculine	+	+	+	+	+	+
Lécithinase	±	±			+	-
Phosphatase	+	+	+	+	+	-
Phosphoamidase(APIZym)	+	+	+	+	+	-
Réduction de NO ₂ »	-	-	+	±	-	-
Pathogénicité pour la	+	-	-	-	+	-
G +C (% mol)	37-39	36-38	36	36	37-38	41-42

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



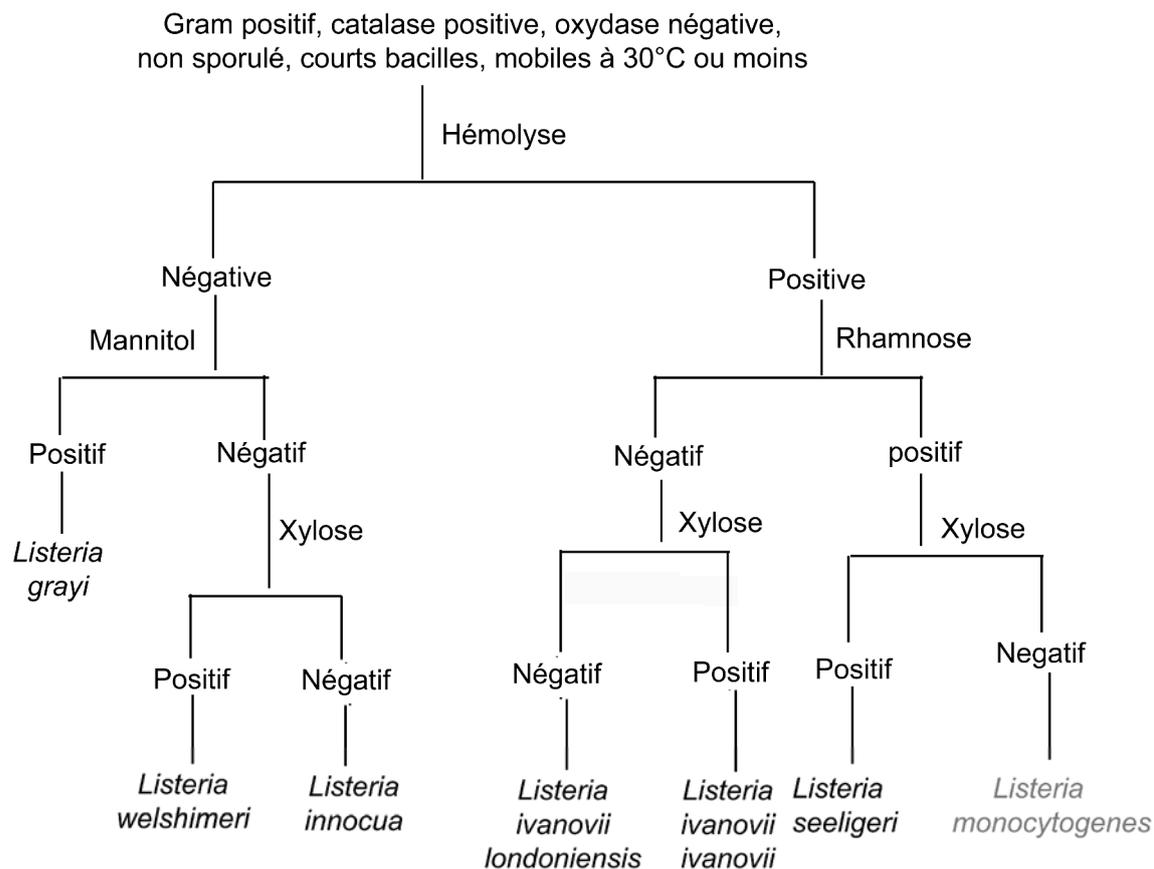
Organigramme 1: Clé dichotomique pour la distinction des espèces du genre *Listeria* (Rocourt, 2000)

Larpent (2004) propose un autre chemin dichotomique pour l'identification des *Listeria spp.* :



Organigramme 2 : Clé dichotomique pour l'identification des *Listeria spp.* (Larpent, 2004)

Gorski (2008), quant à elle, propose le chemin dichotomique suivant :



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

Les caractères différentiels entre *Listeria* et les bactéries voisines, figurent dans le tableau 6.

Tableau 6: caractères différentiels de *listeria* et les bactéries proches.

	<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptococcus</i>
Mobilité à 25°C	+	-	-	-
Catalase	+	-	+	-
Esculine	+	-	-	+
H₂S	-	+	-	-
Lait tournesolé				
- coagulation	-	-	-	+
- réduction	+	-	-	+

5.1. Caractères antigéniques

Dans le genre *Listeria* on distingue plusieurs types de marqueurs de surface tels que les antigènes somatiques (O) et les antigènes flagellaires (H). Ils permettent l'identification immunologique et le sérotypage par l'emploi d'anticorps mono ou polyclonaux correspondants:

- 15 antigènes somatiques O (notés de I à XV)
- 05 antigènes flagellaires H (notés de A à E)

L'assemblage de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars (Larpen, 2004). Les différents caractères antigéniques de *Listeria* sont présentés dans le tableau 7. Un même sérotype peut se retrouver chez deux espèces différentes à l'exception des souches de sérotype 5 qui appartiennent toutes à l'espèce *listeria ivanovii*.

L'intérêt de la sérotypie est limité puisque plus de 95% sont des souches isolées des infections cliniques appartiennent aux sérovars 1/2a, 1/2b ou 4b. Il n'ya pas un lien ou un rapport entre un sérovar particulier et son origine géographique et animale. Actuellement, il est bien connu que le sérovar 4b de *Listeria monocytogene* est le plus impliqué dans le cas de listériose animale et humaine (Euzéby, 2000; Rocourt2002 ; Larpen, 2004).

Tableau 7: Caractères antigéniques des sérovars de *Listeria* (Larpent, 2004).

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

¹ : Les antigènes écrits entre parenthèses ne sont pas présents chez tous les isolats.

² : Quelques souches du sérovar 4b possèdent l'antigène IX.

³ : Selon Seeliger et Jones, certaines souches de *Listeria seeligeri* appartiennent au sérovar 4c

6. Listériose

6.1. Listériose humaine

Avant 1926, un cas d'infection du liquide cébrospinal (Paris 1919) était, par erreur, attribué au bacille diphtérique (*Corynebacterium diphtheriae*) ; chose corrigée plus tard car il s'agissait bien de *L. monocytogenes*.

En 1929, au Danemark, *L. monocytogenes* est isolée de cultures de sang à partir de patients atteints d'une monocytose infectieuse.

En 1936, aux Etats Unis, on établit que la listériose est la cause de septicémie chez les nouveau-nés et de la méningite chez l'adulte.

Au-delà des années 1980, la listériose demeura une maladie relativement obscure n'attirant pas beaucoup d'attention. Au-delà, il devint apparent que *L. monocytogenes* cause des maladies extrêmement sérieuses d'origine invasive et surtout alimentaire menaçante vue l'extension économique de l'industrie agroalimentaire. A titre d'exemple, depuis 1998, la listériose est une maladie à déclaration obligatoire en France, ce qui rend plus précis le suivi de son évolution.

L'incidence annuelle est faible, de 4 à 7 cas par million d'habitants, selon une distribution géographique inégale entre les pays industrialisés et les pays en voie de développement. Dans ces derniers, le nombre de cas est très faible, mais il n'est pas possible de déterminer si cela est dû à une moindre incidence réelle ou à un défaut de diagnostic et/ou de moyen de surveillance (AFSSA, 2000).

Concernant les épidémies de listériose, celles-ci peuvent regrouper un nombre important de cas : plus de 300 cas pour l'épidémie de Grande-Bretagne en 1987-1989, 279 cas pour celle de France en 1992. Elles peuvent durer longtemps : 4 ans pour l'épidémie suisse (Larpen, 2004)

Depuis quelques années, aux Etats-Unis, on a observé une diminution de l'incidence annuelle. Elle est passée de 7,7 à 4,2 cas par million d'habitants entre 1990 et 1993 et depuis cette date, elle oscille entre 3,7 et 5,8 (Rocourt *et al.* 2000).

Le taux moyen de mortalité de listériose humaine est 30% (Wagner, 2008). Il est plus élevé que celui des autres pathogènes contaminants (Mead 1999 ; Mead 2006) tels que *Salmonella enteritidis* (0,38%), *Campylobacter spp.* (0,02-01%) et *Vibrio spp.* (0,005-0,01%).

6. 2. Listériose animale

La listériose affecte différentes espèces animales, elle peut évoluer sous des formes cliniques de façon sporadique ou endémique. Elle peut être également retrouvée en portage asymptomatique.

Chez les bovins, la listériose se présente habituellement et essentiellement sous deux formes cliniques: l'avortement, l'encéphalite ou méningo-encéphalite. (Sanaa, 1994).

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

Les cas de listériose recensés sont plus fréquents en hiver et au printemps et sont corrélés positivement à une ingestion plus importante d'ensilage (Watkins et Sleath, 1981).

Selon le rapport de l'AFSSA, les résultats des investigations sur le portage et l'excrétion mammaire de *Listeria monocytogenes* sont d'une grande variabilité. Le portage peut aller de 0,01% jusqu'à 5 voire 18 à 20 % lors de contrôles successifs et systématiques sur des laits de vaches, de brebis ou de chèvres apparemment saines (AFSSA, 2000).

7. Ecologie

Listeria est une bactérie mésophile, ubiquitaire, Elle est présente dans le sol, plantes, terre, végétation, ensilage et eaux (Larpen, 2004).

La fréquence élevée avec laquelle on isole ce germe du sol et des plantes, la capacité des *Listeria* à se multiplier à basse température, la possibilité de survivre pendant de longues périodes dans le sol, implique une existence saprophytique certaine (Baylon, 1987).

Les interrelations écologiques de *L. monocytogenes*, de l'environnement, des aliments et les affections à listérioses sont représentées sur la figure suivante :

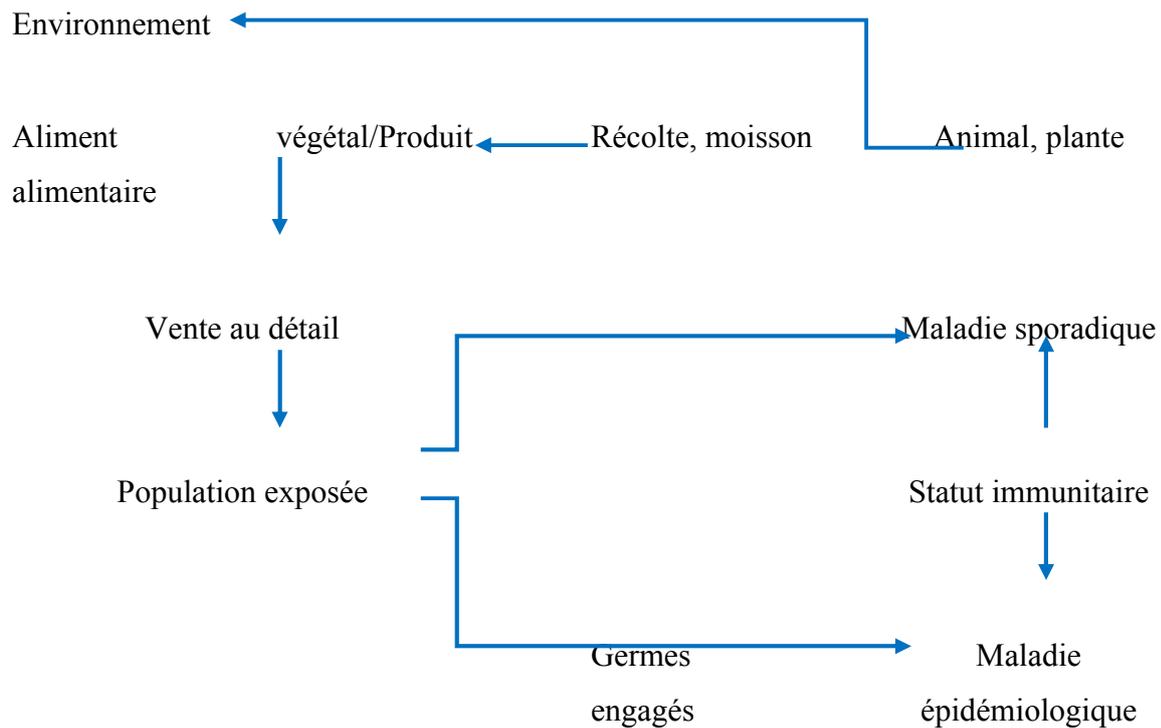


Figure3 : Interrelations écologiques de *L. monocytogenes*, de l'environnement, des aliments et les causes de la listériose (Wagner, 2008).

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

7. 1. *Listeria* et le lait cru

Le lait cru est un excellent milieu de culture pour *Listeria* car il ne subit aucun traitement thermique et sa valeur nutritionnelle est favorable pour son développement, (Bemrah *et al.*, 1998 ; Kim *et al.*, 2008 ; Linton *et al.*, 2008).

La survie de *L. monocytogenes* dans le lait cru résulte d'une série complexe d'interactions influencées par l'adaptation de cette bactérie par rapport à la composition de l'aliment, à sa microflore originelle et aux conditions du processus technologique et de stockage (Wagner, 2008). La contamination du lait cru par *L. monocytogenes* est fonction de la situation géographique et du nombre d'échantillons analysés comme l'indique le tableau suivant :

Tableau 8 : Fréquence de contamination du lait cru de vaches par *Listeria monocytogenes* (Larpen, 2004).

Pays	Année	Nombre d'échantillons		%
		analysés	positifs	
Etats Unis	1987	650	27	4,2
France	1991	664	166	25,0
Espagne	1987	67	30	44,8
Ecosse	1989	540	11	2,0

7. 2. Origine de la contamination du lait cru

Dans le cas d'une contamination interne ou directe, la bactérie peut traverser le tractus intestinal de l'animal, passer dans la circulation sanguine et contaminer le lait au moment de son excrétion. Alors que la contamination externe et indirecte viendra de l'environnement contaminer par *Listeria*. Cette voie est la principale source de contamination du lait cru (El-gazzar et Marth, 1991 ; Bemrah *et al.*, 1998 ; Linton *et al.*, 2008).

Des études effectuées aux USA sur 650 échantillons de lait cru et au Canada sur 315 échantillons de lait cru, ont montré que respectivement 1,3 et 5,4% des tanks à lait étaient contaminés par *Listeria monocytogenes* (Lebres, 2006). Cette fréquence de contamination varie également avec la saison : un plus grand nombre de laits crus sont contaminés par *L. monocytogenes* au printemps et en été (Marth, 1986).

Ces contaminations peuvent être à l'origine d'épidémies de listérioses. En effet l'augmentation importante de l'incidence des listérioses est liée à plusieurs facteurs :

- l'augmentation importante de la fabrication et de commercialisation des produits alimentaires,
- la généralisation de la conservation par le froid qui peut favoriser l'émergence de *L. monocytogenes*, un organisme psychrotrophe,
- l'augmentation des populations sensibles aux *L. monocytogenes* :
 - Personnes âgées (>65 ans),
 - Sujet immunodéprimés :
 - victimes du cancer,
 - personne greffées ou en hémodialyse,
 - malades du SIDA.

Le cycle de contamination du lait cru par *Listeria monocytogenes* inclut les étapes suivantes :

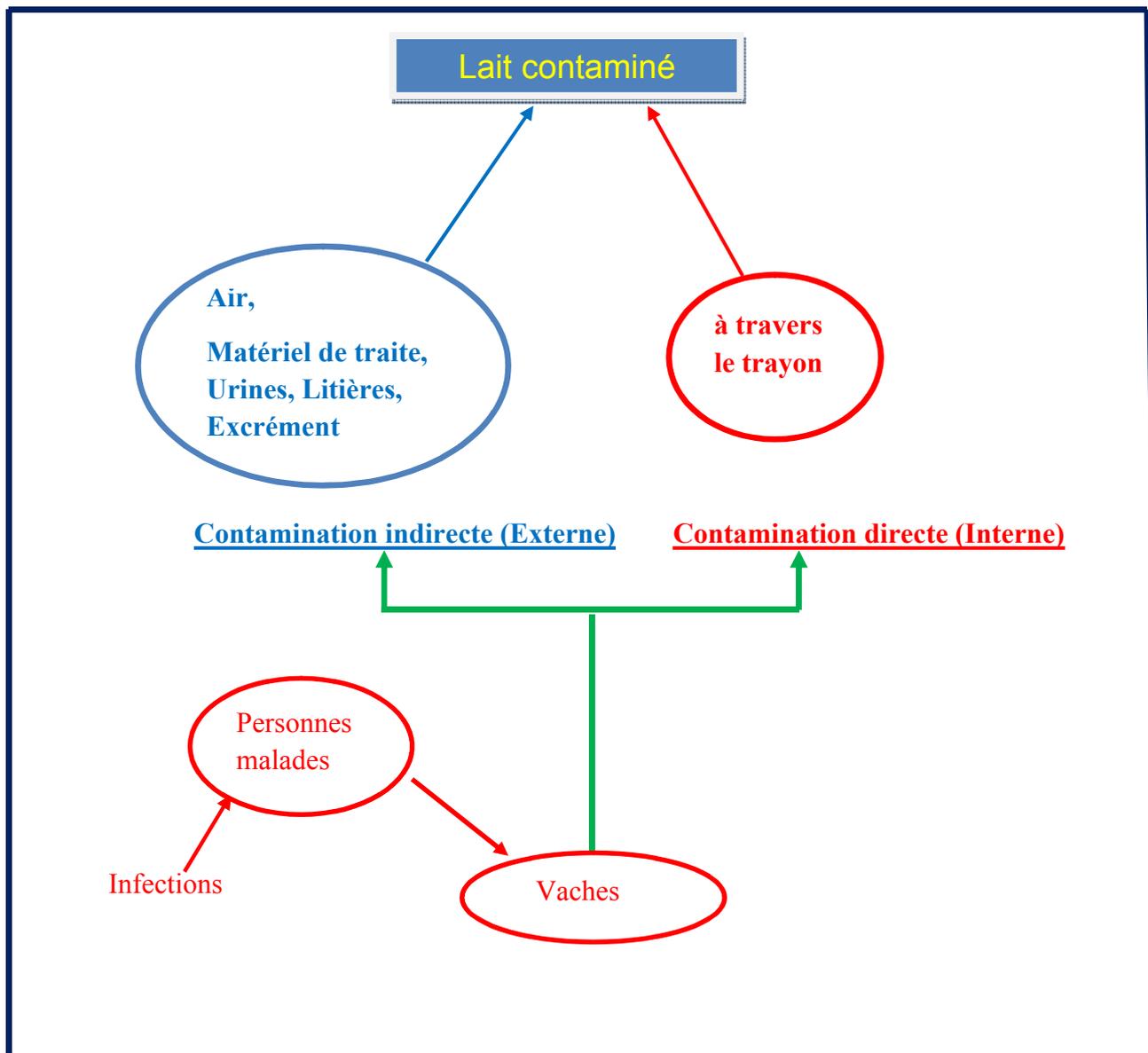


Figure 4: Cycle de contamination du lait (Lebres, 2006)

Chapitre 2: Taxonomie Numérique

1. Définition

La taxonomie ou taxinomie est l'étude de la diversité des micro-organismes et des relations susceptibles d'exister entre eux. Elle consiste à former des groupes d'individus qui se ressemblent selon des critères prédéfinis et à éliminer ceux qui s'en distinguent qui pourront former un autre groupe avec leurs semblables. Ces groupes sont appelés taxons. Deux ou plusieurs taxons peuvent être à leur tour groupés en un nouveau taxon d'un niveau hiérarchique supérieur qui comprendra un plus grand nombre d'individus. De regroupements en regroupements, on arrivera à faire rentrer tous les individus dans un même ensemble (le dendrogramme).

La taxonomie recouvre trois domaines différents: la classification, la nomenclature, et l'identification (Rene-Chaume ,1975; Wayen *et al.*, 1987 ; Euzeby, 2000 ; Larpent, 2000 ; Stackbrandt *et al.*, 2002).

- La classification établit des taxons selon des critères phénotypiques et moléculaires.
- La nomenclature affecte un nom à ces taxons selon un système binomial procédant des lois de Linné dans lequel un nom latin de genre précède le nom d'espèce.
- L'identification assigne les souches inconnues à l'un des taxons décrits.

Les différentes approches taxonomiques sont :

1. Taxonomie phénotypique,
2. **Taxonomie numérique,**
3. Chimio-taxonomie,
4. Taxonomie moléculaire.

La taxonomie numérique a connu un essor remarquable depuis les travaux de Sokal et Sneath (1963) qui ont publié leur travail fondamental "*Principles of Numerical Taxonomy*", qui ouvre une ère nouvelle dans le domaine des classifications (Poncet, 1973). De manière schématique, la méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plusieurs caractères morphologiques, biochimiques, physiologiques et à attribuer pour chaque caractère un code numérique binaire (1 : pour la présence du caractère ou 0 : pour l'absence de ce caractère) (Prescott, 2003).

La taxinomie numérique est fondée sur la mathématisation des données observées par un calcul du coefficient de similitude. Le plus utilisé en microbiologie étant celui de Jaccard (tableau 9)

Tableau 9: Calcul du Coefficient de Jaccard entre deux souches A et B.

$J = \frac{a}{a + b + c}$	a : caractères présents chez les deux souches (1,1)
	b: caractères propres à la souche A (1, 0)
	c: caractères propre à la souche B (0, 1)

Une matrice résumant les valeurs de ces coefficients inter-individus est établie. Les distances taxonomiques entre tous les individus, pris deux à deux, sont alors déduites de la matrice des similitudes selon l'équation : Distance= 1- Similitude

2. La démarche de la taxonomie numérique

Les étapes pour une taxonomie numérique sont les suivantes:

- Choix des individus, c'est-à-dire délimitation du groupe d'intérêt (bactéries, levures,...).
- Choix des caractères et leurs états qui servent à la description des individus.
- Codage des états des caractères : L'intérêt portera sur une matrice de caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques codée de façon binaire (1 et 0 ou + et -) en vue d'une analyse cladistique. Cette étape permet de comparer plusieurs souches sur un ensemble de caractères afin de calculer un coefficient de similarité qui fournit donc une matrice arithmétique. Cette dernière peut être analysée par un programme informatique afin de construire l'arbre, via une matrice de distance.
- Choix des algorithmes de construction: choisir un algorithme pour garantir un résultat optimal, c'est à dire obtenir l'arbre le plus adéquat en un temps de calcul raisonnable. Plusieurs programmes sont actuellement proposés à travers l'Internet et en libres droits.
- Calcul du graphe arborescent : La méthode consiste à regrouper les individus deux à deux et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il ne reste plus que deux groupes. (Réne-Chaume, 1975; Lecoitre, 2001).

3. Méthode de construction des arbres phylogénétiques

Les différentes méthodes phénétiques peuvent être regroupées en plusieurs catégories : les méthodes de distance, les méthodes de parcimonie et les méthodes de vraisemblance. Chacune

d'elles diffère 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).

Pour les méthodes de distance, il s'agit tout d'abord de choisir le critère de distance entre les futures feuilles de l'arbre (individus). 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. Puis on peut utiliser la méthode UPGMA ou celle de NJ pour en déduire l'arbre. Par contre, si ces individus ont été étudiés sur les plans morpho-physico-biochimiques, alors les distances découleront des coefficients de similarité.

3. 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 (OTU) les plus proches et ce groupe est ensuite traité comme un tout, 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).

3. 1. 1. Les étapes de la méthode

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

Etape 2 : Mettre la racine à égale distance des deux OTU i et j c'est-à-dire à $d_{ij}/2$.

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 le début (Lecoitre, 2001).

3. 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 chacune des individus avec les autres. L'arbre est alors construit en reliant les individus les plus proches dans cette nouvelle matrice (Luchetta *et al.*, 2005).

3. 2. 1. Les étapes de la méthode NJ

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

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

$$\mathbf{M}_{(i,j)} = \mathbf{d}_{(i,j)} - [(\mathbf{r}_{(i)} + \mathbf{r}_{(j)}) / (\mathbf{N}-2)]$$

Etape 3 : choix des plus proches voisins, c'est-à-dire des deux OTU ayant le $\mathbf{M}_{(i,j)}$ le plus petit.

Les deux premiers OTU forment un nouveau nœud u ,

Etape 4 : calcul de la distance de chacun des deux OTU par apport au nœud u .

$$\begin{cases} \mathbf{S}_{(i,u)} = \mathbf{d}_{(i,j)}/2 + [\mathbf{r}_{(i)} - \mathbf{r}_{(j)}]/2(\mathbf{N}-2) \\ \mathbf{S}_{(j,u)} = \mathbf{d}_{(i,j)} - \mathbf{S}_{(i,u)} \end{cases}$$

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

Etape 6 : Crier une nouvelle matrice et répéter l'opération depuis le début (Lecoitre, 2001).

Matériel et Méthodes

1. Matériel

1.1. Origine et prélèvement des échantillons de lait cru

Les analyses microbiologiques des échantillons ont été menées au laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie (Université Mentouri Constantine).

Les prélèvements ont été récoltés dans la région Nord-Est d'Algérie (Constantine et Mila) et proviennent de cinq fermes: Trois à Constantine (FC₁, FC₂ et FC₃) et deux à Mila (FM₁ et FM₂) (Tableau 10). Le lait est prélevé aseptiquement à partir d'un pis propre dans un flacon de 250 ml préalablement stérilisé. Il est ensuite transporté dans une glacière jusqu'au laboratoire.

Tableau 10: distribution des échantillons de lait par ferme.

	Constantine (C)			Mila (M)	
Fermes	FC ₁	FC ₂	FC ₃	FM ₁	FM ₂
Nombre	17	15	8	18	12
Total/wilaya	40			30	
Grand total	70				

2. Méthodes

2. 1. Analyse bactériologique

2. 1. 1. Evaluation de la FTAM

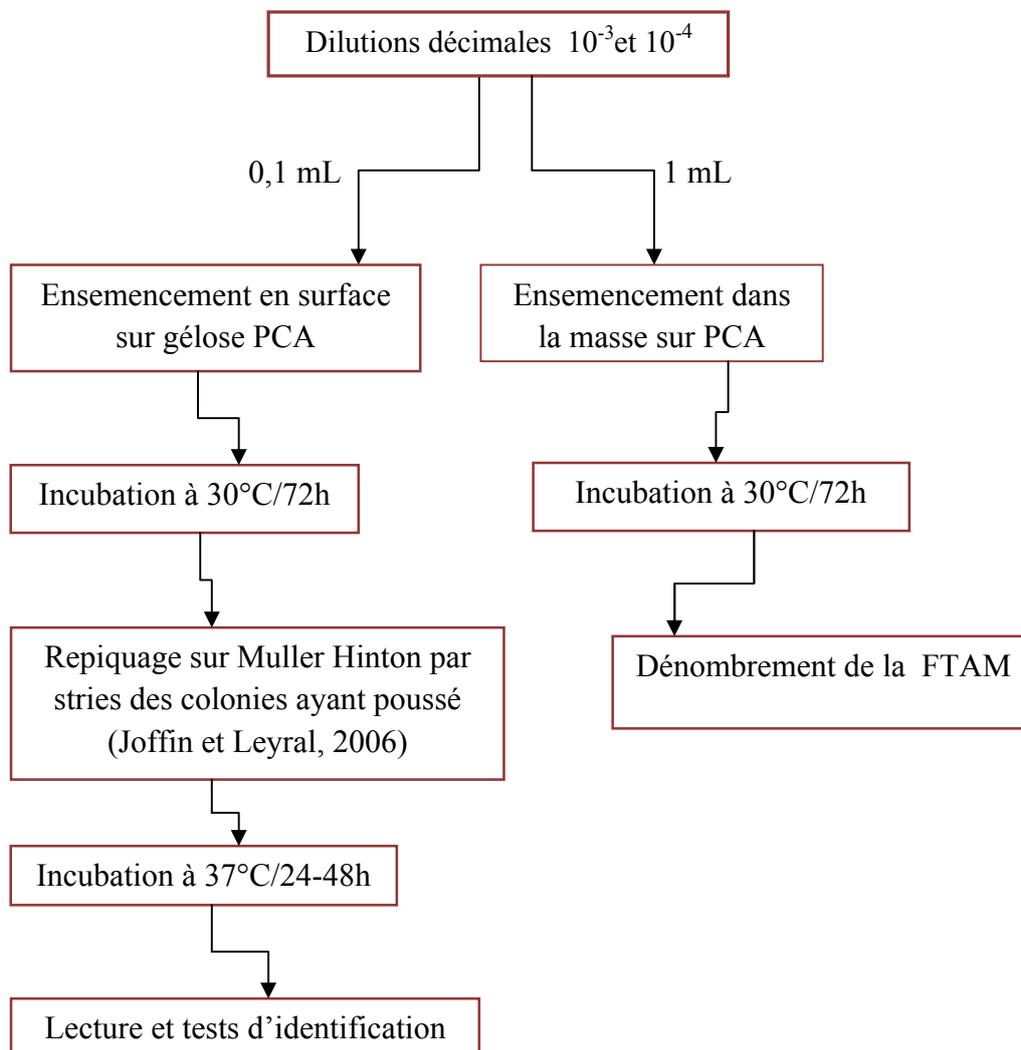
2. 1. 1. 1. Préparation des échantillons

Les échantillons étudiés ont été dilués avec de l'eau physiologique jusqu'à la dilution 10⁻⁴ (Guiraud et Rosec, 2004 ; Dellarras, 2007).

2. 1. 1. 2. Dénombrement et Isolement

A partir des dilutions 10⁻³ et 10⁻⁴, l'ensemencement a été effectué dans la masse et en surface sur gélose PCA. Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C pendant 72 heures (Guiraud et Rosec, 2004).

L'organigramme suivant représente le mode opératoire adopté:



Organigramme 4 : Etapes pour l'évaluation de la FTAM

2. 1. 2. Recherche de *Listeria spp.*

Il existe plusieurs méthodes pour l'enrichissement, la détection, l'identification et l'énumération de *Listeria spp.* dans les produits alimentaires (Gorski, 2008). Au cours de notre travail, nous avons utilisé la méthode d'analyse qualitative (Norme ISO 11290 partie 1).

2. 1. 2.1. Enrichissement

Les échantillons sont stockés pendant quatre semaines dans un réfrigérateur à 4°C afin de favoriser le développement de *Listeria monocytogenes* (Bind *et al.*, 1996 ; Larpent, 2004 ; Rodriguez – Lázaro *et al.*, 2007 ; D'Urso *et al.*, 2009).

2. 1. 2. 2. Isolement

L'isolement des *Listeria spp.* à partir du lait cru de vaches nécessite une méthode performante pour leur sélection. Les *Listeria* sont présentes en faible quantité dans les différents écosystèmes et ne peuvent être isolées par les méthodes courantes utilisées en microbiologie. Leur sélection doit passer par l'élimination des microorganismes qui, par leurs facultés d'envahissement, gênent la croissance des *Listeria*. :

La recherche et l'identification de *Listeria* s'est faite sur trois milieux sélectifs :

a- Gélose Columbia

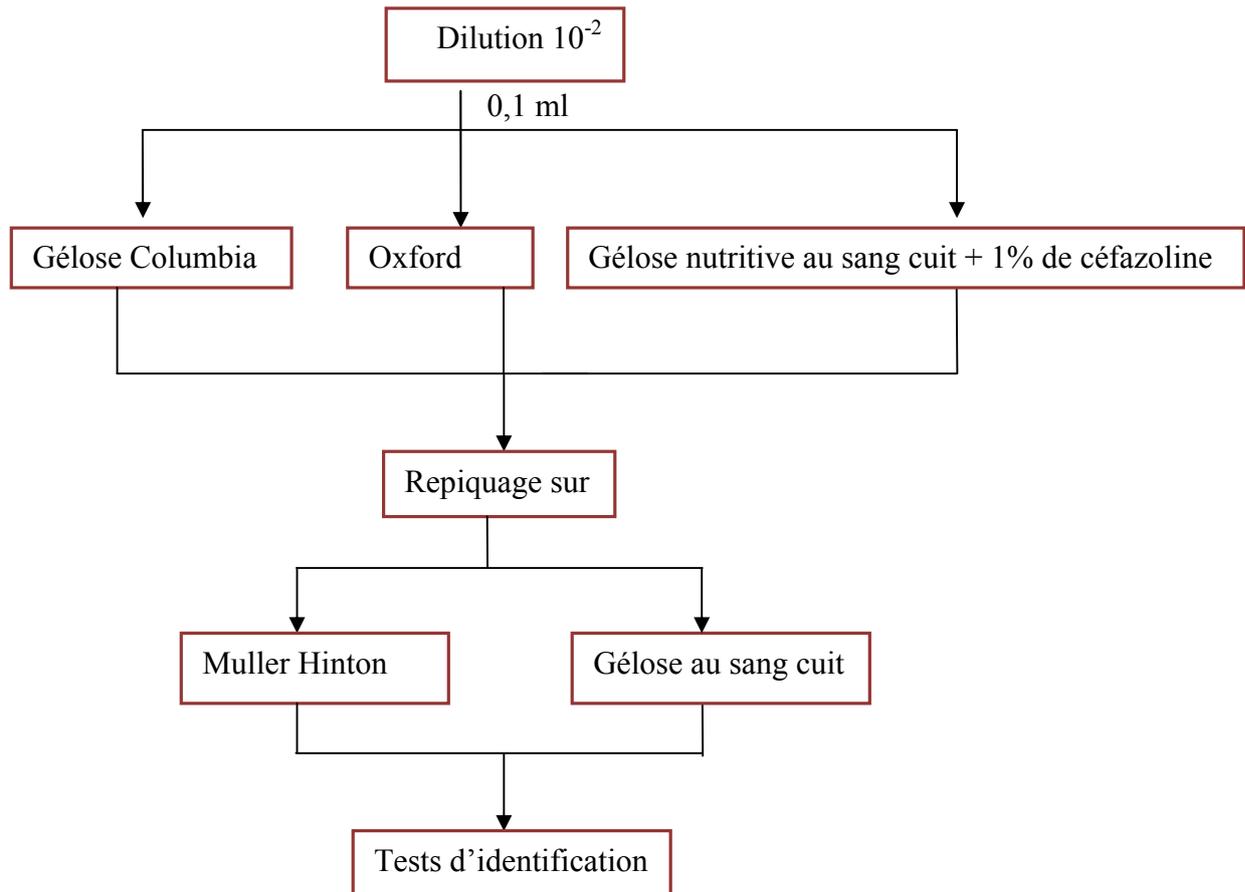
b- Gélose Oxford modifiée au moxalactam.

c- Gélose nutritive (GN) additionnée de 5% sang de cheval et de 1% de céfazoline. Le sang de cheval contient des facteurs favorisant la croissance de *Listeria spp.* et l'addition de la céfazoline inhibe la croissance d'une gamme de bactéries notamment celles à Gram négatif (Joffin et Leyral, 2006).

L'ensemencement a été réalisé en surface avec 0,1 ml de lait cru provenant d'un échantillon longuement conservé à froid (quatre semaines à 4°C) et dilué à 10^{-2}

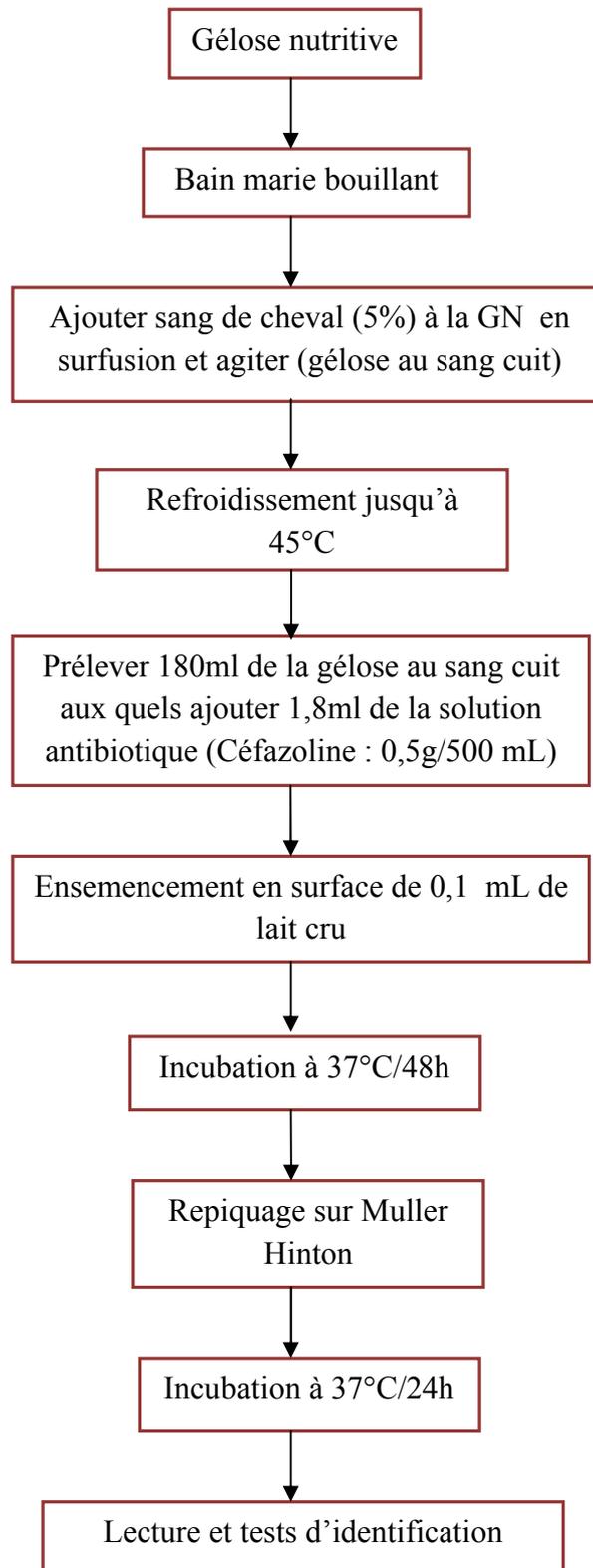
L'incubation a eu lieu à 37°C pendant 24 à 48 heures, puis une série de repiquages a été effectuée sur MH et sur gélose au sang cuit ; ceci permet de vérifier la pureté des souches.

L'ensemble des étapes suivies pour l'isolement et l'identification de *Listeria spp.* est résumé selon l'organigramme suivant :



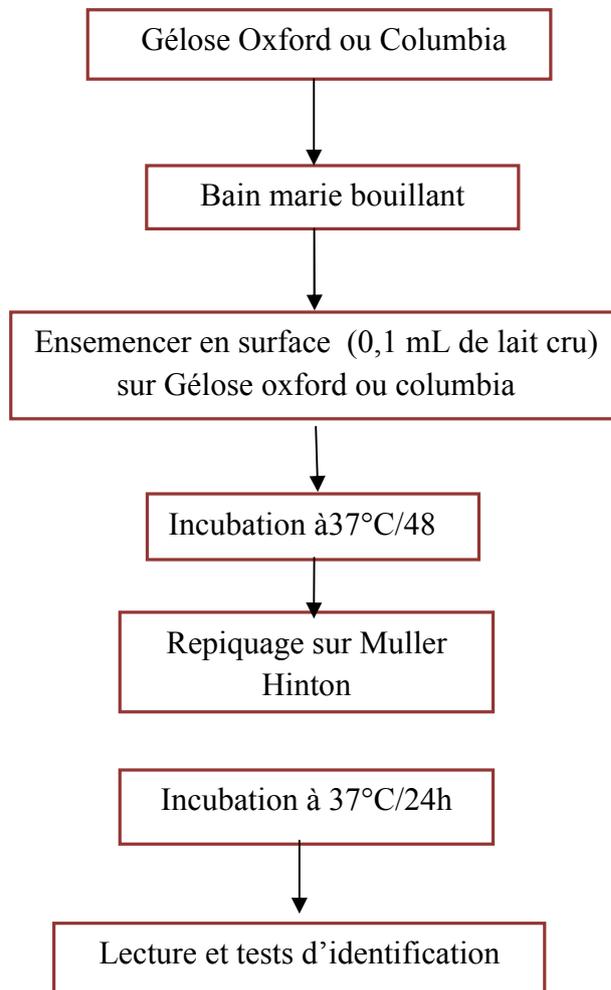
Organigramme 5: Etapes pour l'isolement et l'identification de *Listeria* spp. dans le lait cru

L'isolement et l'identification de *Listeria spp.* selon la technique de la gélose nutritive au sang cuit additionnée de céfazoline ont été réalisés selon l'organigramme suivant :



Organigramme 6: Mode opératoire pour l'isolement et l'identification de *Listeria spp.* sur gélose au sang cuit additionnée de céfazoline

Les étapes pour l'isolement et l'identification de *Listeria spp.* sur gélose Oxford et Columbia sont :



Organigramme 7: Mode opératoire pour l'isolement et l'identification de *Listeria spp.* sur gélose Oxford et gélose Columbia.

1. 2. Tests d'identification

L'identification des isolats est réalisée en effectuant les tests suivants :

1. 2. 1. Tests préliminaires

Cette étape a pour but de vérifier la pureté des souches. Elle constitue une première orientation en fonction de la morphologie (macroscopique et microscopique), le Gram, la sporulation et la catalase.

1. 2. 2. Tests physiologiques

Seul, le test de la température a été réalisé ; faute de moyens. Les isolats purs sont repiqués sur gélose nutritive et incubés à des températures différentes (22°C, 37°C, 44°C) pendant 24 heures.

1.2.3. Tests biochimiques : 13 tests ont été effectués

1- Test de l'Uréase

2- Test de l'indole

3- Test du citrate

4- Test mannitol mobilité

5- Test VP

6- Test RM

7- Test TSI

8- Test nitrate-réductase

9- Test ONPG

10- L'hydrolyse de l'esculine

11- Test de l'oxydase

12- Décarboxylase ODC, LDC et dihydrolases ADH bactériennes

13- Métabolisme des hydrates de carbones (Lactose, Saccharose, Arabinose, Cellobiose, Dulcitol, Maltose, Mannose, Mélibiose, Raffinose, Rhamnose, Salicine, Sorbitol, Trehalose, Xylose, Fructose, Ribose, Glycérol.

1. 2. 4. Les milieux sélectifs et la conservation des souches

Des milieux sélectifs ont été employés pour mettre en évidence des caractères propres à certains genres bactériens. La gélose Hektoen est un milieu sélectif pour l'isolement des genres appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La gélose SS est utilisée pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella*. (Joffin et Leyral, 2006)

La conservation des souches a été réalisée en tubes sur GN inclinée. La conservation des tubes s'est faite à 4°C (Rocourt, 1997 ; Euzéby, 2000 ; Lawrence *et al*, 2001).

1. 2. 5. Etablissement de la codification des états des caractères

Le tableau suivant résume la codification établie pour les différents états des caractères étudiés

Tableau 11: Codage des états des caractères.

	Code 1	Code 0
Forme	Bacille	Coque
Mobilité	Mobile	Immobile
Tests physiologiques	Pousse	Pas de pousse
Tests biochimiques	Résultat positif	Résultat négatif

1.3. L'analyse phylogénétique

1. 3. 1. Calcul du coefficient de similitude de Jaccard et matrice de distances

La taxonomie numérique, nous a permis de construire une matrice numérique de type 1/0 (matrice binaire). Cette dernière a résulté d'une transformation mathématique basée sur le calcul de l'indice de similarité (S). A partir des valeurs de S, une matrice de distances a été calculée :

$$d = 1 - s$$

Cette transformation a permis d'obtenir une matrice arithmétique qui permettra les calculs statistiques pour la construction des arbres phylogénétiques.

1. 3. 2. Reconstruction de l'arbre phylogénétique

Nous avons employé la méthode basée sur le calcul des distances qui repose sur deux algorithmes distincts à savoir UPGMA et NJ.

Nous notons, à ce stade, que les constructions phylogénétiques ont concerné les deux groupes bactériens (Gram positif et Gram négatif) chacun à part. Les calculs des arbres ont été effectués sur MEGA ver. 4.0 (Kumar, 2008) aimablement fournis par le Dr. M. Kitouni.

1.4. L'analyse factorielle des correspondances

Une AFC a été effectuée sur le logiciel STATISTICA ver 6.0 pour mettre en évidence les associations qui existeraient entre la nature du Gram et l'algorithme de construction employé.

Résultats et discussion

1. Résultats

1.1. L'analyse Bactériologique

1. 1. 1. Evaluation de La flore totale aérobie mésophile du lait cru (FTAM)

1. 1. 1. 1. Dénombrement des colonies

Les résultats de dénombrement sont représentés dans les tableaux (12 et 13).

Le dénombrement sur le milieu PCA est effectué à partir de la dilution 10^{-3} . Le résultat a révélé que le nombre de colonies des échantillons de Constantine est compris entre 13×10^3 et 81×10^3 UFC/ mL avec une moyenne de 40×10^3 UFC/ mL; tandis que les échantillons de Mila contiennent approximativement une moyenne proche de celle de Constantine estimée à 45.10^3 UFC/ mL, les valeurs sont répartis entre 19 et 76×10^3 UFC/ mL.

1.1.1.2. Aspect des colonies

Nous avons obtenu une gamme de colonies de tailles variables (petites, moyennes, et grandes), de couleurs différentes (blanches, jaune, crème, crème foncé et transparente), et de forme circulaire, plissé à striation concentrique avec un pourtour régulier ou irrégulier.

1.1.2. Recherche de *Listeria spp.*

Après quatre semaines d'enrichissement à froid (4°C), l'isolement de *Listeria spp.* a donné :

- Sur gélose Columbia: nous avons obtenu des colonies de tailles variables (petite et moyenne) de couleurs différentes (blanche, transparente et crème) de forme circulaire avec un pourtour régulier.

- Sur gélose au sang cuit additionnée de céfazoline : Par comparaison aux résultats obtenus sur le milieu sans antibiotique, il y a eu une sélection et une réduction du nombre de colonies qui poussent. Les colonies les plus dominantes se présentent avec une couleur crème et de petite taille.

- Sur gélose Oxford: les colonies développées présentent une couleur grisâtre, de forme circulaire et de taille moyenne ou grande.

Tableau 12 : Dénombrement de la FTAM des échantillons de Constantine 10^3 UFC/ml

Echantillons		Nombre de colonies	Echantillons		Nombre de colonies	
FC ₁	E1	33	FC ₂	E21	34	
	E2	47		E22	36	
	E3	28		E23	13	
	E4	45		E24	70	
	E5	16		E25	66	
	E6	42		E26	46	
	E7	31		E27	41	
	E8	20		E28	43	
	E9	22		E29	51	
	E10	57		E 30	37	
	E11	18		E 31	81	
	E12	47		E32	17	
FC ₂	E13	41	FC ₃	E33	32	
	E14	39		E34	38	
	E15	58		E35	46	
	E16	55		E36	21	
	E17	40		E37	53	
	E18	42		E38	14	
FC ₂	E19	28		E39	64	
	E20	36		E40	45	
Nombre de colonies moyen = 40/échantillon						

Tableau 13 : Dénombrement de la FTAM des échantillons de Mila 10^3 UFC/ml.

Echantillons		Nombre de colonies	Echantillons		Nombre de colonies
FM ₁	E1	48	FM ₁	E16	42
	E2	37		E17	47
	E3	45		E18	25
	E4	23	FM ₂	E19	52
	E5	43		E20	58
	E6	64		E21	19
	E7	66		E22	45
	E8	75		E23	44
	E9	73		E24	22
	E10	35		E25	76
	E11	39		E26	40
	E12	48		E27	23
	E13	35		E28	34
	E14	51		E29	39
	E15	46		E30	60
Nombre de colonies moyen = 45/échantillon					

Les résultats des examens macroscopique et microscopique des isolats sont représentés dans les tableaux 14 et 15.

L'étude descriptive (macroscopique et microscopique) a permis de sélectionner 61 isolats répartis en 32 souches (notées de C1 à C32) pour la wilaya de Constantine et 29 (notées de M1 à M29) pour la wilaya de Mila.

Tableau 14: Résultats des examens macroscopique et microscopique des isolas de Constantine.

	Couleur	Forme	contour	Taille	Aspect	Observation microscopique
C1	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 1,9mm	Lisse	Bactéries en amas
C2	Blanche	Circulaire	Régulier	Grande 4,2 mm	Lisse	Diplobacilles, chainettes en bacilles
C3	Crème	Circulaire	Irrégulier	Grande 4 mm	Lisse	Bacilles isolés, Diplobacilles
C4	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 0,5 mm	Lisse	Coccobacilles isolés, chainettes en coccobacilles sous forme V
C5	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 1mm	Brillante	Bacilles isolés
C6	Grise	Circulaire	Régulier	Petite 1mm	Lisse	Coccobacilles isolés
C7	Crème	Circulaire	Régulier	Petite 1,3mm	Lisse	Diplocoques
C8	Jaune	Circulaire	Régulier	Moyenne 2mm	Lisse	Coques isolés, bactéries en amas
C9	Transparente	Circulaire	Régulier	Petite 0,8mm	Lisse	Diplocoques, chainettes en cocci
C10	Jaune	Circulaire	Régulier	Grande 4 mm	Lisse	Coques isolés, bactéries en amas
C11	Transparente	Ovale	Régulier	Moyenne 2,2mm	Lisse brillante	Diplocoques, bactéries en amas
C12	Blanche	Circulaire	Régulier	Grande 3,5mm	Lisse	Coques isolés, bactéries en amas
C13	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite	Brillante	bacilles isolés et en courte chainettes
C14	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,5 mm	Lisse	Chainettes en bacilles
C15	Crème	Circulaire	Régulier	Petite 1,4mm	Lisse	Coccobacilles, chainettes en bacilles
C16	Crème	Circulaires	Régulier	Moyenne 2 mm	Lisse brillante	Diplocoques, en tétrades
C17	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 1,5 mm	Lisse	Bacilles isolés, chainettes en bacilles
C18	Transparente	Ovale	Régulier	Petite 1mm	Lisse brillante	Coques isolés, diplocoques
C19	Blanche	Circulaire	Irrégulier	Grande 4,5mm	Lisse	Diplocoques, chainettes en cocci
C20	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne	Lisse	Bacilles isolés

C21	Crème	Circulaire	Régulier	Grande	Lisse	Bacilles isolés, diplobacilles
C22	Jaune	Circulaire	Régulier	Petite 1,6 mm	Lisse	Bactéries en amas
C23	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,3 mm	Brillante	Bacilles isolés, chainettes en bacilles
C24	Transparente	circulaire	Régulier	Petite 0,7 mm	Brillante	bactéries en amas
C25	Jaune	Circulaire	Régulier	Moyenne 2 mm	Lisse	bactéries en amas
C26	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,6 mm	Lisse brillante	Bacilles isolés, en chainettes
C27	Crème	circulaire	Régulier	Moyenne 2,8 mm	Lisse brillante	Diplocoques, en tétrades
C28	Crème	Circulaire	Régulier	Grande 4 mm	Lisse	Diplobacilles, bacilles isolés
C29	Jaune foncé	Circulaire	Régulier	Moyenne 1,9 mm	Lisse	Coques isolés, en amas
C30	Blanche	Circulaire	Irrégulier	Petite 1,4 mm	Lisse	Bacilles isolés
C31	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 1,3 mm	Lisse brillante	Diplocoques, bactéries en amas
C32	Crème	Circulaire	Irrégulier	Grande 0,5 mm	Lisse Brillante	Coques isolés, diplocoque chainette en cocci

Tableau 15: Résultats des examens macroscopique et microscopique des isolats de Mila.

	Couleur	Forme	Contour	Taille	Aspect	Observation microscopique
M1	Jaune	Circulaires	Régulier	Grande 4mm	Lisse	Coques
M2	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,1mm	Brillante	Bacilles isolés
M3	Blanche	Plissé à striation concentrique	Régulier	Moyenne 2,3 mm	Lisse brillante	Diplocoques et en tétrades
M4	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,8 mm	Lisse brillante	Diplocoques et en tétrades
M5	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 3mm	Lisse	Diplocoques
M6	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,5 mm	Brillante	Bacilles isolés, Chainette en bacilles
M7	Crème	Circulaire	Irrégulier	Moyenne 2,4 mm	Lisse brillante	Diplocoques, chainette en cocci
M8	Crème	Circulaire	Régulier	Petite 1,5mm	Lisse	Bacilles isolées et en chainettes
M9	Jaune foncé	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,6 mm	Lisse	Coques isolés, amas
M10	Jaune foncé	Circulaire	Irrégulier	Moyenne 2,4mm	lisse	Diplocoques et en chainettes
M11	Crème	Circulaire	Régulier	Petite 2,5mm	Lisse	Diplobacilles
M12	Blanche	Circulaire	Régulier	petite	Lisse	Bacilles isolées
M13	Transparente	Circulaire	Régulier	Grande 4,6mm	Lisse Brillante	Diplocoques en chainettes
M14	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 1,4mm	Lisse	Bacilles isolés
M15	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,8mm	Lisse	Bacilles isolés
M16	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,8mm	Lisse	Bacilles isolées
M17	Jaune claire	Circulaire	Régulier	Moyenne 2,9mm	Lisse	Coques en amas
M18	Blanche	Circulaire	Irrégulier	Moyenne 2,6mm	Lisse	Bacilles
M19	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite 1,2mm	Lisse	Coques isolés, chainettes en cocci
M20	Crème	Circulaire	Irrégulier	Moyenne	Lisse	Chainette en cocci

M21	Grise	Circulaire	Régulier	Petite 1,5mm	Lisse	Bacilles isolés, chainettes en bacilles
M22	Crème	Circulaire	Régulier	Petite	Lisse	Bacilles isolés
M23	Blanche	Circulaire	Régulier	Petite	Lisse	Bacilles fin
M24	Blanche	circulaire	Régulier	Moyenne	Lisse	Bactéries en amas
M25	Crème	Circulaire	Régulier	Moyenne	Lisse	Bacilles isolés
M26	Blanche	Circulaire	Régulier	Moyenne	Lisse brillante	Bacilles isolés chainettes en bacilles
M27	Transparente	Circulaire	Irrégulier	Grande	Lisse	Diplocoques
M28	Transparente	Punctiforme	Irrégulier	Petite	Lisse brillante	Diplocoque, Chainettes en cocci
M29	Crème	Circulaire	Régulier	Petite	Lisse	Bacilles isolés chainettes en bacilles

1. 2. L'identification des isolats

Les résultats obtenus sont représentés sur une matrice binaire (tableaux 16 a et 16 b).

Caractères Souches		Caractères morphologiques					Caractères physiologiques				
		Forme	Gram	Endospore	Mobilité à 22° C	Mobilité à 37°C	Catalase	Oxydase	Croissance à 20°C	Croissance à 37° C	Croissance à 45° C
C ₄ , C ₆ , C ₁₅ , M ₂₁	S1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
C ₂₃ , C ₃₂	S2	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
C ₂ , C ₂₁ , M ₁₁	S3	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
C ₃	S4	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
C ₅	S5	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0
C ₇	S6	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
C ₈ , C ₁₀ , C ₂₅ , C ₂₉ , M ₁	S7	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1
C ₉	S8	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
C ₁₁ , C ₁₈	S9	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
C ₁₂ , M ₂₄	S10	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
C ₁₃ , M ₆	S11	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1
C ₁₄ , C ₁₇ , M ₁₀ , M ₁₄	S12	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1
C ₂₇ , M ₄	S13	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
C ₂₄ , M ₁₃ , M ₂₈	S14	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
C ₁₉ , C ₃₁ , M ₅ , M ₇ , M ₂₇	S15	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
C ₂₀ , M ₁₂ , M ₂₅	S16	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1
C ₂₂ , M ₉ , M ₁₇	S17	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
C ₂₆ , M ₈ , M ₂₆	S18	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0
C ₂₈ , M ₁₆ , M ₂₂	S19	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0
C ₃₀ , M ₁₈ , M ₂₃	S20	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
M ₂	S21	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0
C ₁₆ , M ₃	S22	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1
M ₁₅	S23	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
M ₂₉	S24	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1
C ₁ , M ₁₉ , M ₂₀	S25	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1

Tableau 16 b : Matrice binaire des caractères biochimiques des isolats

Caractères		Urée	IND	NIT	CIT	VP	RM	ADH	LDC	ODC	ESC	ONPG	LAC	SAC	MAN	ARA	CEL	DUL	MAL	MAn	MEL	RAF	RHA	SAL	SOR	TRE	XYL	FRU	RIB	GLY
Souches																														
C ₄ , C ₆ , C ₁₅ , M ₂₁	S1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1
C ₂₃ , C ₃₂	S2	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
C ₂ , C ₂₁ , M ₁₁	S3	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
C ₃	S4	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
C ₅	S5	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
C ₇	S6	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
C ₈ , C ₁₀ , C ₂₅ , C ₂₉ , M ₁	S7	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1
C ₉	S8	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0
C ₁₁ , C ₁₈	S9	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
C ₁₂ , M ₂₄	S10	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
C ₁₃ , M ₆	S11	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
C ₁₄ , C ₁₇ , M ₁₀ , M ₁₄	S12	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C ₂₇ , M ₄	S13	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0
C ₂₄ , M ₁₃ , M ₂₈	S14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1
C ₁₉ , C ₃₁ , M ₅ , M ₇ , M ₂₇	S15	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0
C ₂₀ , M ₁₂ , M ₂₅	S16	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
C ₂₂ , M ₉ , M ₁₇	S17	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
C ₂₆ , M ₈ , M ₂₆	S18	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0
C ₂₈ , M ₁₆ , M ₂₂	S19	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C ₃₀ , M ₁₈ , M ₂₃	S20	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
M ₂	S21	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1
C ₁₆ , M ₃	S22	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0
M ₁₅	S23	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
M ₂₉	S24	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
C ₁ , M ₁₉ , M ₂₀	S25	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0

Après traitement des informations morphologique, physiologique et biochimique des 61 isolats, il s'est avéré que certains isolats se répétaient (ayant les mêmes résultats morphologique, physiologique et biochimique) d'où l'obtention, à la fin, de 25 souches représentatives non redondantes (S₁-S₂₅).

Selon Abré *et al.* (1979); Holt *et al.* (1994); Bourgeois *et al.* (1996); Leyrol et Joffin (2001); ces caractères nous laissent supposer que ces bactéries pourraient faire partie des genres mentionnés dans le tableau 17 :

Tableau 17 : Identification présomptive des souches

Souches	Isolats	Identification présomptive
S ₁	C4, C6, C15, M21	<i>Listeria</i>
S ₂	C23, C32	<i>Enterococcus</i> 1
S ₃	C2, C21, M11	<i>Acinetobacter</i>
S ₄	C3	<i>Bacillus</i>
S ₅	C5	<i>Lactobacillus</i> 1
S ₆	C7	<i>Enterococcus</i> 2
S ₇	C8, C10, C25, C29, M1	<i>Staphylococcus</i> 1
S ₈	C9	<i>Streptococcus</i> 1
S ₉	C11, C18	<i>Leuconostoc</i> 1
S ₁₀	C12, M24	<i>Staphylococcus</i> 2
S ₁₁	C13, M6	<i>Lactobacillus</i> 2
S ₁₂	C14, C17, M10, M14	<i>Escherichia</i>
S ₁₃	C27, M4	<i>Pediococcus</i> 1
S ₁₄	C24, M13, M28	<i>Leuconostoc</i> 2
S ₁₅	C19, C31, M5, M7, M27	<i>Streptococcus</i> 2
S ₁₆	C20, M12, M25	<i>Citrobacter</i>
S ₁₇	C22, M9, M17	<i>Streptococcus</i> 3
S ₁₈	C26, M8, M26	<i>Salmonella</i>
S ₁₉	C28, M16, M22	<i>Kleibseilla</i>
S ₂₀	C30, M18, M23	<i>Pseudomonas</i>
S ₂₁	M2	<i>Lactobacillus</i> 3
S ₂₂	C16, M3	<i>Pediococcus</i> 1
S ₂₃	M15	<i>Proteus</i> 1
S ₂₄	M29	<i>Proteus</i> 2
S ₂₅	C1, M19, M20	<i>Lactococcus</i>

1.3. L'analyse phylogénétique

Les tableaux 16 a et 16 b (pages 41 et 42) ont servi pour la construction de deux matrices binaires (Gram positif et Gram négatif): tableaux 18 et 20).

Le calcul du coefficient de Jaccard de chaque matrice binaire pour chaque type de Gram a donné une matrice de similarité à partir de laquelle une matrice de distances a été calculée (tableaux 19 et 21).

Les arbres phylogénétiques de chaque type de Gram sont motionnés dans les figures 5, 6, 7 et 8.

	Caractères morphologiques				Caractères physiologiques			Caractères biochimiques																										
	FOR	Spor _e	MO 22°C	MO 37°C	CAT	20 C°	45 C°	IND	NIT	CIT	VP	RM	ADH	LDC	ODC	ESC	LAC	SAC	MA N	ARA	CEL	MAL	MA _n	MEL	RAF	RHA	SAL	SOR	TRE	XYL	RIB	GLY		
S1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1		
S2	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1		
S4	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0		
S5	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0		
S6	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1		
S7	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0		
S8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0		
S9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0		
S10	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	
S11	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
S13	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	
S14	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0
S15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
S17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
S21	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	
S22	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	
S25	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	

Tableau 19: Matrice de distance des souches à Gram positif

	S1	S2	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S13	S14	S15	S17	S21	S22
S2	0,54															
S4	0,58	0,66														
S5	0,54	0,38	0,59													
S6	0,50	0,21	0,65	0,50												
S7	0,68	0,52	0,62	0,59	0,40											
S8	0,66	0,33	0,72	0,38	0,45	0,59										
S9	0,75	0,72	0,80	0,62	0,65	0,66	0,78									
S10	0,63	0,60	0,57	0,65	0,47	0,29	0,77	0,50								
S11	0,72	0,69	0,60	0,68	0,58	0,57	0,63	0,85	0,60							
S13	0,55	0,57	0,61	0,55	0,52	0,72	0,57	0,82	0,68	0,71						
S14	0,60	0,69	0,72	0,68	0,58	0,70	0,69	0,56	0,71	0,63	0,65					
S15	0,54	0,42	0,54	0,29	0,38	0,52	0,42	0,64	0,60	0,63	0,57	0,50				
S17	0,59	0,42	0,65	0,25	0,42	0,57	0,29	0,62	0,65	0,73	0,55	0,61	0,18			
S21	0,58	0,70	0,62	0,57	0,60	0,66	0,70	0,73	0,61	0,45	0,72	0,52	0,59	0,69		
S22	0,55	0,31	0,61	0,26	0,45	0,60	0,31	0,75	0,61	0,65	0,40	0,77	0,41	0,26	0,72	
S25	0,63	0,35	0,69	0,31	0,40	0,55	0,35	0,60	0,55	0,66	0,52	0,72	0,44	0,31	0,61	0,21

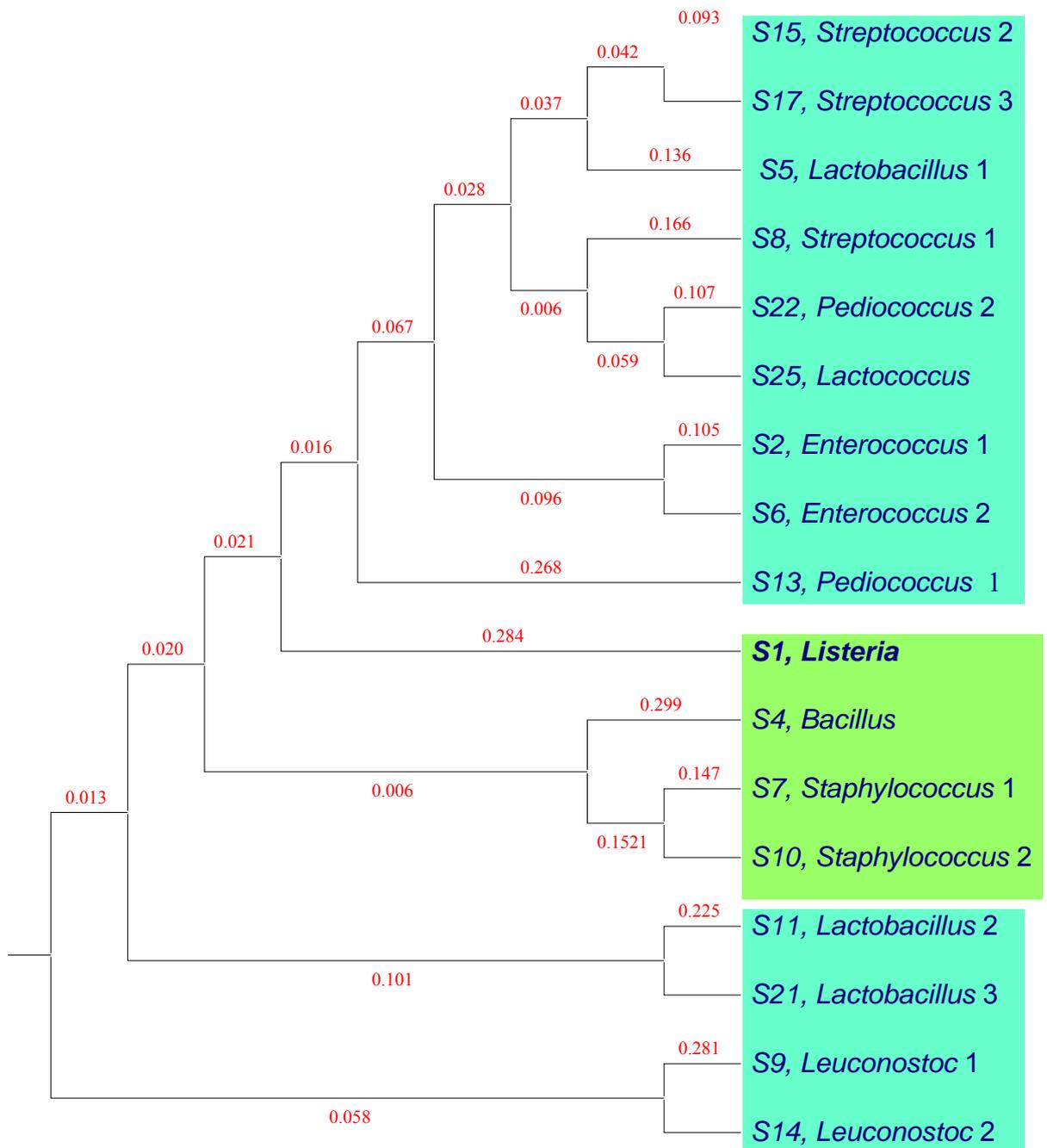


Figure 5: Arbre phylogénétique des souches à Gram positif construit selon la méthode UPGMA

Lactobacillales

Bacillales

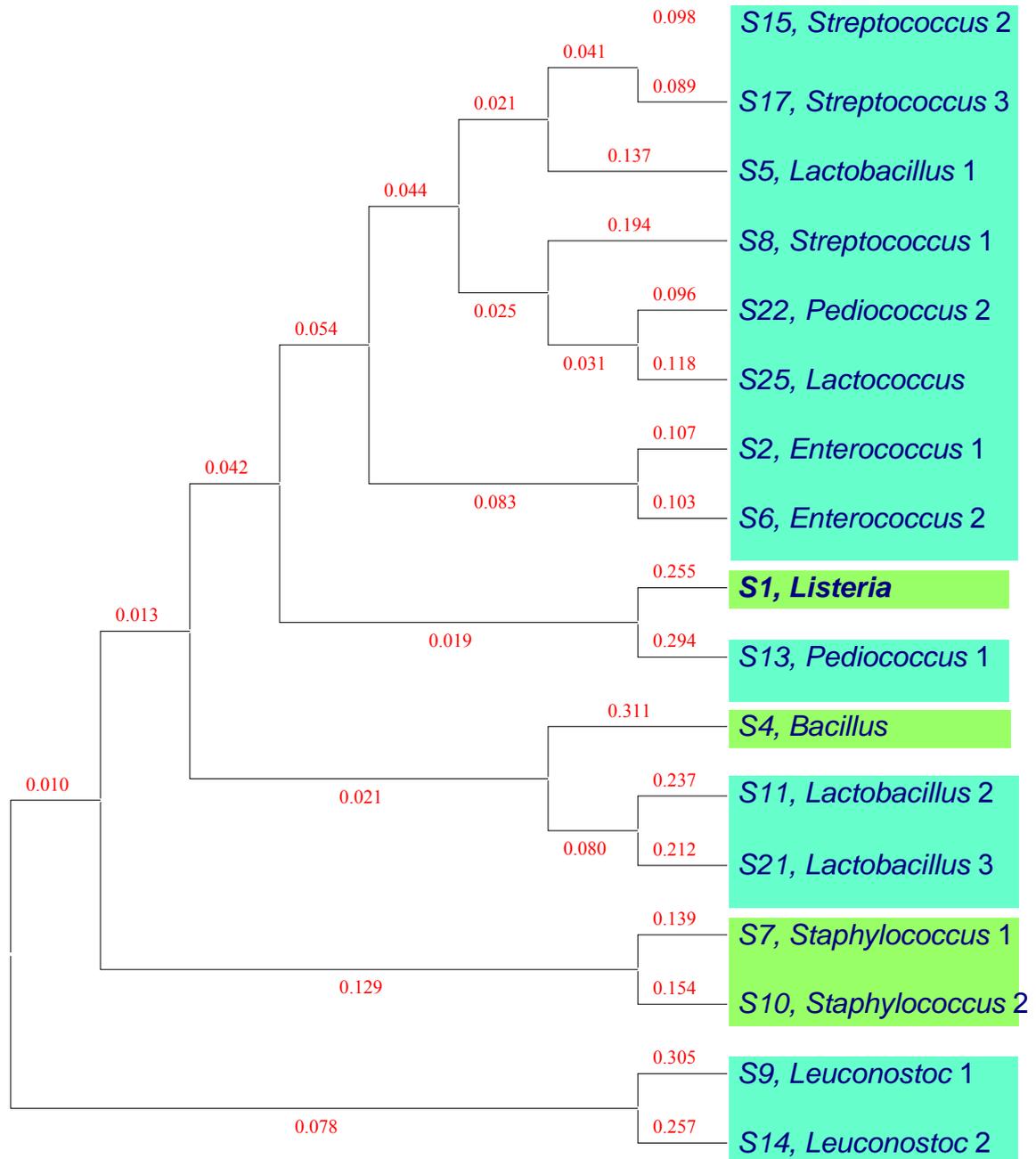


Figure 6: Arbre phylogénétique des souches à Gram positif construit selon la méthode NJ.

Lactobacillales

Bacillales

Les deux méthodes ont aboutit à des arbres non racinés. L'analyse typologique permet de constater qu'au plus haut de l'arbre, les nœuds ont contribué à la création de deux groupes phylogénétiques distincts. La distance à ce point est de 0,058 en UPGMA et de 0,078 en NJ. Le premier groupe (clade) comprend les deux souches du genre *Leuconostoc* (S9 et S14) sur les deux arbres.

Mais ces distances restent relativement élevées. Nous sommes alors passés au stade suivant (vers le bas) afin de rétrécir la distance. Nous nous plaçons à la distance 0,101 sur UPGMA et à la distance 0,129 sur NJ. A ce stade de distances, il y a trois groupes phylogénétiques distincts :

- Sur UPGMA : (S9, S14) + (S11, S21) + (reste des souches),
- Sur NJ : (S9, S14) + (S7, S10) + (reste des souches)

La descente à l'étage suivant (distance = 0,006 sur UPGMA et distance = 0,021 sur NJ) permet la distinction de quatre groupes phylogénétiques ; à savoir :

- Sur UPGMA : (S9, S14) + (S11, S21) + (S4, S7, S10) + (*Listeria* et le reste des souches),
- Sur NJ : (S9, S14) + (S7, S10) + (S4, S11, S21) + (*Listeria* et le reste des souches)

La construction UPGMA des bactéries à Gram positif a révélé trois regroupements : deux, de l'ordre des *Lactobacillales* et un de l'ordre des *Bacillales* dont *Listeria*.

Le clade regroupant *Bacillus* (souche S4), et les deux *Staphylococcus* (S7 et S10) est éloigné de *Listeria* par la faible distance de 0,027 (0,006 + 0,021).

Sur la topologie NJ, nous constatons une légère séparation de *Listeria* du reste des *Bacillales* ; à savoir *Bacillus* (S4) et *Staphylococcus* (S7 et S10).

Cependant, il est à retenir que certains genres ont conservé leur position dans les deux arbres. C'est le cas des genres de l'ordre des *Lactobacillales* ; à savoir *Streptococcus* (S8, S15, S17), *Lactobacillus* (S5), *Pediococcus* (S22), *Lactococcus* (S25) et *Enterococcus* (S2 et S6).

De manière globale, nous retenons que les deux algorithmes ont aboutit à des configurations légèrement différentes qui n'ont pas affecté la hiérarchie systématique des

divisions microbiennes ; ce à l'exception de *Pediococcus* (S13) qui a formé un clade avec *Listeria* dans la méthode NJ.

Tableau 20: Matrice binaire des souches à Gram négatif.

	Caractères morphologiques				Caractères physiologique		Caractères biochimiques																															
	FOR	OXY	MO22C°	MO37C°	CAT	45C°	Uréase	IND	NIT	CIT	VP	RM	ADH	LDC	ODC	ESC	LAC	SAC	MAN	ARA	CEL	DUL	MAL	MAN	MEL	RAF	RHA	SAL	SOR	TRE	XYL	FRU	RIB	GLY				
S3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
S12	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S16	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	
S18	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	
S19	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S20	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	
S23	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
S24	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	

Tableau 21: Matrice de distance des souches à Gram négatif.

	S3	S12	S16	S18	S19	S20	S23
S12	0,8065						
S16	0,8148	0,2813					
S18	0,7222	0,3226	0,3214				
S19	0,8214	0,2727	0,3750	0,4194			
S20	0,9524	0,5938	0,5714	0,6786	0,6452		
S23	0,9286	0,5806	0,6207	0,5600	0,7188	0,6818	
S24	0,8095	0,5313	0,6129	0,6667	0,6061	0,7500	0,4000

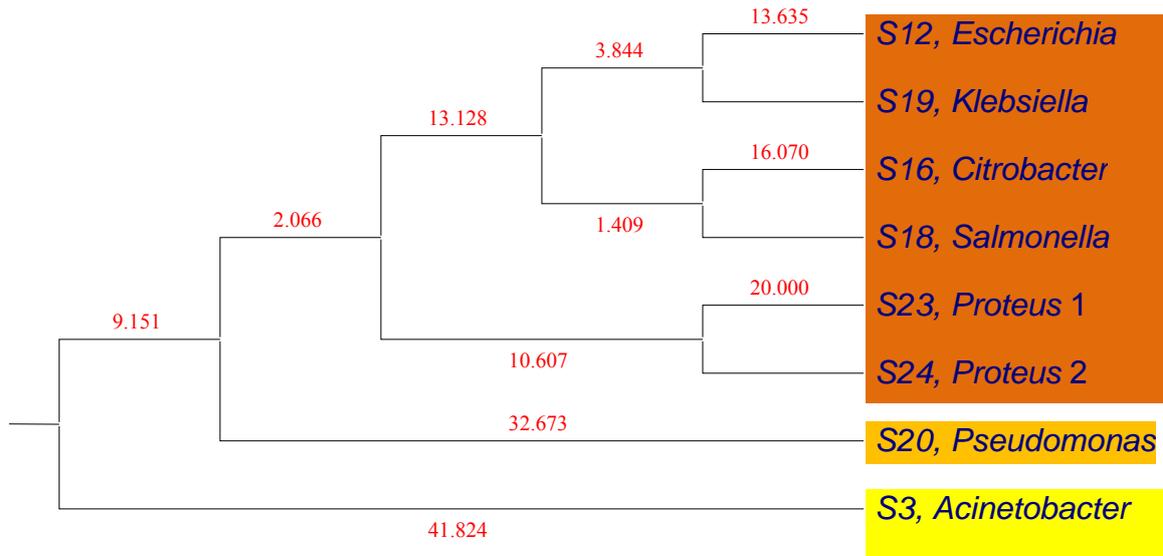


Figure 7: Arbre phylogénétique des souches à Gram négatif construit selon la méthode UPGMA.

- Enterobacteraceae*
- Pseudomonadaceae*
- Moraxellaceae*

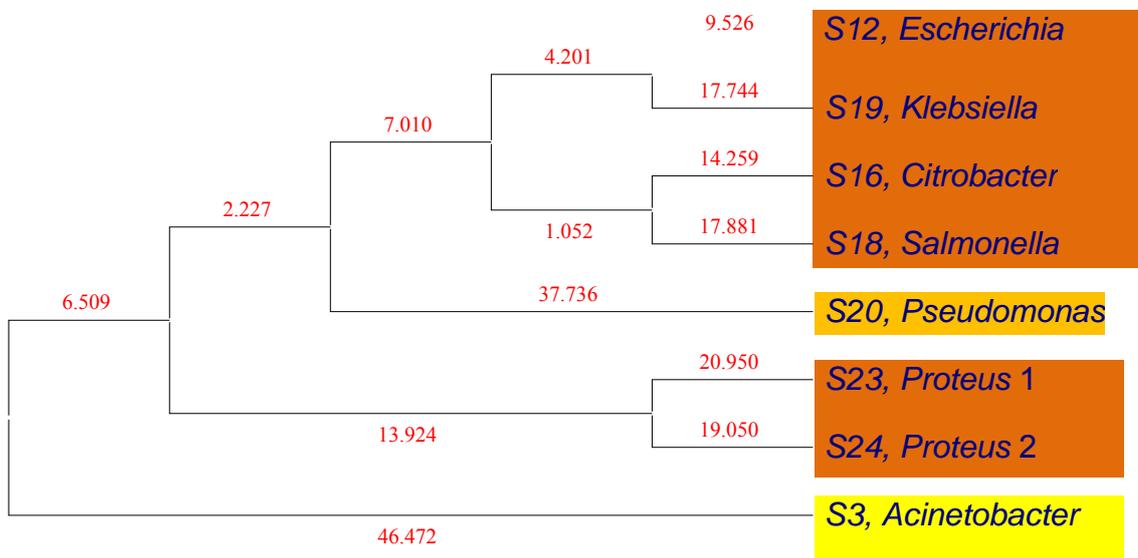


Figure 8: arbre phylogénétique des souches à Gram négatif construit selon la méthode NJ.

- Enterobacteraceae*
- Pseudomonadaceae*
- Moraxellaceae*

Concernant les souches à Gram négatif, les deux algorithmes ont fourni le même premier groupe ; *Acinetobacter* (S3). En descendant de plus en plus dans l'arbre, nous retenons que dans les deux cas il y a eu conservation de certaines souches dans leur clade : S12, S19, S16 et S18.

Il ressort donc que les deux algorithmes ont aboutit à des topologies similaires mais non identiques.

1.4. L'analyse factorielle des correspondances

L'association type de Gram/ Méthodes de construction a été vérifiée par une AFC. La figure 9 donne le résultat suivant :

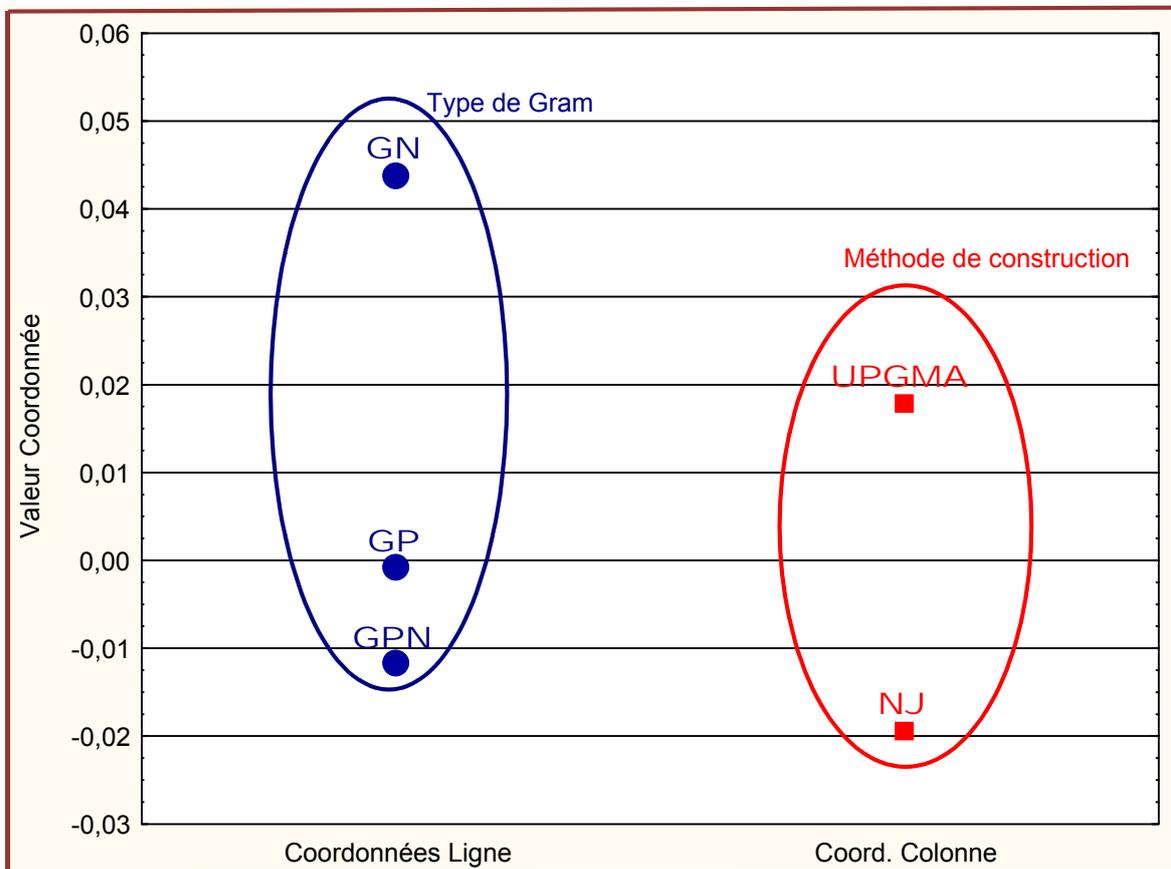


Figure 9: Inter corrélation entre les deux algorithmes utilisés et la coloration de Gram.

L'AFC a confirmé l'indépendance des deux algorithmes utilisés par rapport à la coloration de Gram. En effet, nous constatons la formation de deux groupes distincts : un regroupant les types de Gram, l'autre les méthodes de construction. Les deux groupes sont, en effet, éloignés l'un de l'autre.

Les divergences et les similarités des propriétés morphologiques, physiologiques et biochimiques des souches bactériennes sont mesurées par les deux algorithmes de manière indépendante du Gram. En d'autres termes, quelque soit leur appartenance (Gram positif ou Gram négatif), les bactéries conservent toujours leurs liens phylogénétiques à l'intérieur de leurs groupes respectifs.

2. Discussion

Cette étude a été menée dans le but de mettre en évidence la présence de *Listeria spp.* dans le lait cru de vaches laitières élevées dans différents environnements et de dresser un profil phylogénétique basé sur une taxonomie numérique de l'ensemble des caractères phénotypiques des souches isolées.

Le dénombrement de la FTAM sur le milieu PCA révèle une moyenne de 40 à 45 $\cdot 10^3$ UFC/mL. Ces résultats concordent avec les normes citées par Ercolini *et al.* (2009) estimées à $5 \cdot 10^3 - 6 \cdot 10^5$ UFC/mL.

Cependant, Barbano *et al.* (2006) ont obtenu des valeurs supérieures aux nôtres. Ce même auteur a signalé qu'une valeur de 10^5 UFC/mL est considérée comme indice de bonne qualité de lait.

Notre résultat se rapproche de celui de Niro *et al.* (2009) (10^4 UFC/ml), qui prédit (à partir de cette moyenne) la présence des bactéries pathogènes dont *Listeria monocytogenes* et *Salmonella enteridis*.

Il nous est donc possible d'affirmer, comparativement à ces données et au JORADP, que les laits crus analysés (Constantine et Mila) présentent une bonne qualité microbiologique.

La diversité de la forme, de la couleur et de l'aspect des colonies relevées sur gélose Columbia et sur gélose au sang cuit signifierait que le lait cru serait un milieu favorable pour la croissance d'une gamme large de bactéries dont l'origine est soit lactique, soit ubiquitaire.

La dominance des petites colonies crèmes sur le milieu gélose au sang cuit additionné de céfazoline peut être justifiée par l'effet inhibiteur de l'antibiotique vis-à-vis les bactéries Gram négatif.

L'aspect macroscopique des colonies de couleur crème ressemble approximativement, d'après Rocourt (2000), à celui du genre *Listeria*. La même tendance est enregistrée dans le

cas du milieu sélectif Oxford, où les colonies verdâtres rappellent le genre *Listeria* d'après Guiraud et Rosec (2004).

L'identification des isolats a fait ressortir 25 souches différentes dont 13 sont des bactéries lactiques : *Enterococcus* 1, *Enterococcus* 2, *Lactobacillus* 1, *Lactobacillus* 2, *Lactobacillus* 3, *Streptococcus* 1, *Streptococcus* 2, *Streptococcus* 3, *Leuconostoc* 1, *Leuconostoc* 2, *Pediococcus* 1, *Pediococcus* 2 et *Lactococcus* , alors que les 12 restantes sont des bactéries ubiquitaires dont la présence est corroborée par , Ercolini *et al.* (2009) qui ont montré l'existence de *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* et *Pseudomonas*.

Nos résultats confirment la présence de *Listeria* dans les échantillons avec un taux de 5,71%. Ces résultats sont, d'une part, conformes à ceux obtenus par Varadar-Ünlü *et al.* (2000) ; soit 4% et par Van kessel (2004) ; soit 6,5% et d'autre part, ils sont supérieurs à ceux rapportés par Larpent (1995) ; Soriano (2000) ; Holko *et al.*(2002) ; Lebres et Guetarni (2002) et par Hamdi *et al.*(2007) qui ont trouvé des pourcentages de 1,9%, 2,9%, 2,56%, 1,96% et 2,61% respectivement.

Le faible taux d'isolement de *Listeria spp.* peut être du à :

- Un développement d'*Enterococcus*, *Lactococcus*, et les bactéries lactiques qui secrètent des bactériocines et enterocines (A) inhibiteurs de *Listeria spp.* (Héchard *et al.* 1993; Klocke *et al.*, 2005 ; Martin *et al.*, 2007 ; Guerrieri *et al.*,2009 ; Chen *et al.*, 2009).

- Les travaux de Huang *et al.* (2009) ont montré également l'inhibition de la croissance de *Listeria monocytogenes* par les pediocines 05-10.

- La production de bactériocine inhibitrice de *Listeria monocytogenes*, selon Choi *et al.* (2000) cité par Bayoub *et al.* (2006), est influencée par le pH du milieu de culture. Le maximum de production de la bactériocine nisin-like produite par *Lactococcus lactis subsp lactis* A164 est observé à pH 6.

- L'utilisation limitée des ensilages (dans notre pays) dans l'alimentation du bétail.

- *Listeria spp.* se développe mieux en période de froid. Or notre recherche a été effectuée au printemps. Cette justification est vérifiée par celle notée par Fassel *et al.* (1996) qui ont confirmé l'incidence climatique et l'incidence saisonnière sur le développement de *Listeria*.

L'établissement d'un profil phylogénétique basé sur une taxonomie numérique de l'ensemble des caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des 25 souches isolées, nous a permis de qualifier le rapprochement de ces dernières en fonction de leurs différences.

Le rapprochement de la souche S1 (*Listeria*) aux genres de l'ordre *Lactobacillales* est déjà signalé par Larpent (2000) en vue de l'établissement de l'arbre phylogénétique des *Bacillaceae*, et d'un dendrogramme des *Bacillales* et des *Lactobacillales*.

La faible différence enregistrée entre les arbres phylogénétiques construits selon les méthodes UPGMA et NJ confirme la divergence des fondements de ces deux algorithmes.

Les arbres phylogénétiques des souches à Gram positif et à Gram négatif révèlent une différence moins importante. En effet, la coloration de Gram est un caractère distinctif dans la classification bactérienne. Cette observation a été confirmée par une AFC mettant en évidence le caractère d'indépendance des algorithmes vis-à-vis du Gram.

En fin, il est à retenir que les caractères retenus dans cette étude ne peuvent en aucun cas être une référence pour aboutir à des conclusions précises de systématique bactérienne.

Au contraire, en systématique bactérienne, l'identification de l'espèce est un aboutissement d'un "mélange" d'approches taxonomiques qui il faut manipuler avec prudence.

Nous recommandons donc l'emploi de techniques d'analyses chimiques (structures membranaires et organelles), génétiques (ADN, ARN 16S, microsattellites, ...), et immunologiques (marqueurs antigéniques de surface), en plus des données phénotypiques (morphologie, biochimie et physiologie) pour mieux refléter les relations phylogénétiques intra et inter spécifiques.

En fin, nous nous penchons vers l'emploi de la méthode NJ plutôt que UPGMA pour le plus de précision apporté lors de l'éclatement des groupes. Cela exprime que NJ tient compte d'un élément important (absent en UPGMA) : il s'agit de la contribution de chaque souche par rapport à l'ensemble des espèces (divergence nette). En UPGMA, l'algorithme tient compte des deux souches les plus rapprochées mais pas de l'interaction d'une souche avec le reste des bactéries comme pour le cas de NJ.

L'enracinement (out group) et le bootstrapping n'ont pas été pris en considération car ils n'intéressent pas les objectifs tracés. En effet, ces deux paramètres "optionnels" permettent

une lecture intra- arbres et ne reflètent en aucun cas la différence entre les deux algorithmes employés.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les objectifs essentiels de ce travail étaient de mettre en évidence la présence de *Listeria spp.* dans le lait cru de vaches et l'application d'une méthode numérique pour évaluer les interactions de la flore bactérienne du lait cru et apprécier la place de *Listeria spp.* à leur égard.

Nous avons essayé de faire intervenir le maximum de caractères distinctifs dans la recherche des similitudes entre les souches isolées et de rassembler dans une classe de similitudes (clade) les souches les plus semblables.

La comparaison des résultats obtenus avec les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques des bactéries a permis une identification présumptive des souches isolées et un regroupement phylogénétique, en utilisant deux algorithmes différents.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les genres suivants : *Listeria*, *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Pediococcus*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Lactococcus*.

Ces résultats préliminaires montrent la validité de la taxonomie numérique ainsi que la construction des arbres phylogénétiques dans l'étude de rapprochement entre les bactéries.

Au terme de ce travail, il ressort que :

- La qualité bactériologique (FTAM) est acceptable
- Les méthodes d'isolement des *Listeria spp.* ont aboutit
- Les topologies des arbres (NJ+ UPGMA) ont fait ressortir à chaque fois des regroupements monophylétiques et polyphylétiques significatifs d'interactions dépendantes de l'environnement bactérien immédiat.

Enfin, au point de vue perspective, nous insistons sur une étude plus poussée concernant les statuts de contamination par *L. monocytogenes* pour en faire un meilleur indicateur dans les environnements de productions laitières. Comme il est également adéquat de procéder à des méthodes systématiques pluridisciplinaires englobant tous les outils phylogénétiques dont les alignements des ARN 16S, chimiotaxonomie et autres approches taxonomiques aboutissant à l'installation d'un algorithme phylogénétique plus adéquat qui mettra en

exergue les relations de parenté intra et interspécifiques pour une systématique plus approfondie.

Références Bibliographiques

-
- Abré A., Buttiaux R., Pilet C. *et al.* (1979). Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne. 2^{ème} édition. Doin. Paris. Lavoisier. ISBN : 2- 704060632- 9. 430 p.
 - Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2000). Rapport de la commission *Listeria* de L'AFSSA. [En ligne]. <http://web.afssa.fr>. (Consulté le 28 Octobre 2001).
 - Atlas R. M. (2005). Hand book of media for environmental microbiology. 2^{ème} édition. CRC Press. 664 p.
 - Augustin J. C. (1986). Résistances de *Listeria monocytogenes* aux traitements physique. *Pathol. Biol.* **44** (9): 790- 807.
 - Avril J. L., Dabernat H., Denis F. *et al.* (2000). Bactériologie clinique. 3^{em} édition. Ellipse. p. 140- 150.
 - Barbano D. M., Ma Y. and Santos M. V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *J. Dairy Sci.* **89** : 15- 19.
 - Baylon N. (1987). Recrudescence des Listérioses. *Med. Nutri.* **6** (23) : 399- 401.
 - Bayoub K. , Elotmani F., Assobhei O., Jaoua S. et Saucris A. (2006). Contribution à l'étude des bactériocines produites par des souches isolées du lait fermenté traditionnel « Raib ». *Congré Intenational de biochimie*. Agadir: 417- 420.
 - Bemrah N. , Sanna M. , Cassin M. H. , Griffiths M. W. and Cerf O. (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prevent.Veter. Med.* **37**: 29- 145.
 - Berche B. , Brisabois A. , Catteau M. , Flandrois J. P. et Rocourt J. (2000) .Rapport de la commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes*. Commission *Listeria* AFSSA.
 - 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.
 - Bind J. L., Avoine C. et Delavale J. (1996). Analyse critique des méthodes d'isolement, de dénombrement et d'identification des *Listeria* en agro-alimentaire, *Pathol. Biol.* **44**: 757- 768.

- Blancher G. (2000). Epidémiologie et prophylaxie des listérioses. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*. **184** (2) : 261- 265.
- Bourgeois C. M., Mescle J. F. et Zucca J. (1996). Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome1. Technique et documentation. Londres- Paris- New York. Lavoisier. ISBN : 7430- 0037- 6. 672 p.
- Chaturongakul S. and Boor K. (2006). Sigma B activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (8): 5197-5203.
- Chen H., Neetoo H., Ye M. and Joerger R. O. (2009). Differences in pressure tolerance of *Listeria monocytogenes* are not correlated with other stress tolerances and are not based on differences in CtsR. *Food Microbiol.* **25** : 404- 408.
- Choi H- J., Cheigh C- I., Kim S-B. et Pyun Y- R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* sub sp *lactis*. A164 isolated from Kimchi. *J. Appl. Microbiol.* **88**: 563- 571.
- Darlu P., Tassy P., (2004). La reconstruction phylogénétique. Concepts et méthodes. Masson. Paris. ISBN : 2- 225- 84229- 9. 241 p.
- Dellarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Technique et documentation. France .Lavoisier. ISBN : 978- 2- 743060945- 8. 462 p.
- D'Urso O. F., Poltronieri P., Marsigliante S., Storelli C., Hernández M. and Rodriguez-Lázaro D. (2009). A filtration- based real time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiol.* **26**: 311- 316.
- 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.
- El- Gazzar F. E. and Marthe E. H., (1991). *Listeria monocytogenes* and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: A review II. *Listeria monocytogenes* and dairy technology. *Milchwissenschaft*, **46**: 82- 86.

- Ercolini D., Russo F., Ferrocino I. and Villani F. (2009). Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiol.* **26**: 228- 231.
- Euzéby J. P. (2000). Bactériologie Vétérinaire : Les *Listeria*. [En ligne]. Créé le : 25 Juin 2000. <http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/nomstaxons.html>. (Consulté le 25 Avril 2010).
- 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.
- Farber J. M., Peterkin P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*. a food- borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55**: 476- 511.
- Felsenste J. (1973). Maximum likelihood and minimum- steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Syst. Zool.* **22**: 240–249.
- Fitch W. M. and Margoliash E.(1967). Construction of phylogenetic trees: A methode based on mutation distances as estimated from cytochrome c sequence is of general applicability. *Sci.* **155** (760): 279– 284.
- Frevacque L. (1999). *Listeria monocytogenes* [En ligne]. <http://perso.wanadoo.fr/laufr/Listeria>. (Consulté le 23 octobre 2010).
- 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.
- George S. M., Lund P.M. and Brocklehurst T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes* . *Lett. Appl. Microbiol.* **6**: 153- 156.
- Gordon D. E. and Smith M. M. (1953). Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species description of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacterial.* **66** : 41-48.
- Guerrieri E., De Niederhäusern S., Messi P., Sabia C., Iseppi R., Anacarso I *et al.* (2009). Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a samll – scale model. *Food Control.* **20**: 861- 865.
- Guiraud J. P. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod. Paris. ISBN : 2- 10- 007259. 652 p.

- Guiraud J.P., Rosec J.P.(2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. France. ISBN: 2- 12- 445211-8. 398 p.
- Hamdi T. M., Naïm M., Martin P. and 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.
- Héchard Y., Renault D., Cenatiempo Y., Letellier F., Maftah A., Jayat C. *et al* (1993). Bactériocines - Taxonomie. Les bactériocines contre *Listeria* : une nouvelle famille de protéines ?. *Lait.* **73** : 207- 213.
- Holko I., Urbanová J., Kantiková M., pastorová K., kmet V. (2002). PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta vetLJerinaria Brno.* **71**: 125- 131.
- Holt J. G., Krieg N. R., Sneath P. H. A. *et al* (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th edition. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 p.
- Huang Y., Luo Y., Zhai Z., Zhang H., Yang. C., Tian H. *et al.* (2009). Characterisation and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus peutosaceus*.05- 10 isolated from Sichuan Pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. *Food Control.* **20**: 1030- 1035.
- Jacquet C. et Rocourt J. (1993). Microbiologie des *Listeria* et épidémiologie de la listériose humaine. *L'information du biotechnicien.* **1** : 11- 19.
- Jeantet R., Groguenmec T., Schuck P. *et al.* (2007). Science des aliments. Technologie des produits alimentaires (V2) Technique et documentation. Londres- Paris- New York. Lavoisier. ISBN : 978- 2 - 7430 - 0888 – 8. 452 p.
- Joffin J. N. et Leyrol G. (2006). Microbiologie technique. Tome1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. ISBN : 2-86617-515-8. 363 p.
- Kim, E- L., Choi. N. H., Bajpai V. K. and Kang. S. C. (2008). Synergistic effect of nicin and garlic shoot juice against *Listeria monosytogenes* in milk. *Food Chem.* **110**: 375- 382.
- Klocke M., Mundt. K., Idler F., Jung. S. and Bachhausen J- E. (2005). Hetrologous expression of enterocin A, a bacteriocin from enterococcus faecium,fused to a cellulose-

binding domain in *Escherichia coli* results in a functional protein with Inhibitory activity against *Listeria*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **67**: 532- 538.

- Kovincic I., Vujcic., I. F., Svabic- Vlahovic M., Vulic M., Gajic M. and Wesley I. V. (1991). Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and repining of Trappist cheese. *J. Food Protection.* **54**: 418- 420.

- Kumar S., Nei M., Dudley J. and Tamura K. (2008). MEGA 4: A biologist- Centre Soft ware for evolutionary analysis of DNA and protein sequence. *Briefings in bioinformatics.* **9** (4): 299- 306.

- Larpent J.P. (2000). Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Technique et documentation. Londres- Paris-New York. Lavoisier. ISBN : 26743060417- 7. 261 p.

- Larpent J. P. (2004). *Listeria*. 3ème édition. Technique et documentation. Londres- Paris- New York. Lavoisier. ISBN : 2- 7430-065769. 227 p.

- Lawrance C., Fitzmorris A., Andrew O. and Joel M. (2001). Is *Listeria monocytogenes* an important pathogen for prosthetic joints? *J. C Rheumatol.* **7** (1): 34- 37.

- Lebres E. A. (2006). Etude de prévalence et analyse du risque de *Listeria monocytogenes* dans les laits crus dans la région centre. Thèse de Doctorat. Centre universitaire d'El Taref. 158 p.

- Lecointre G. et Le Guya der H. (2001). Classification phylogénétique du vivant. Belin. Paris. ISBN : 2- 7011- 4273- 3. 537 p.

- Le Mennier A. et Leclercq A. (2009). *Listeria* et listériose : des animaux d'élevage à nos assiettes. *Pathol. Biol.* **5** :17- 22.

- Leyrol G. et Joffin J. N. (2001). Microbiologie technique -Tome2- Technique et documentation. 2^{ème} édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. 299 p.

- Linton M., Mackle A. M., Upadhyay V. K., Kelly A. L. and Patterson M. F. (2008). The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* **9**: 423- 428.

- Luchetta P., Maurel M. C., Higuete D. *et al.* (2005). Evolution moléculaire. Dunod. Paris. ISBN : 2 10 006880 6. 330 p.
- Marth E. H. (1986). *Listeria* in dray foods. *Cheese Rep.* **111**: 1.
- Mead P. S. (1999). Food related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* **5**. p. 607.
- Mead P. S. (2006). Nation wide outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiol. Infect.* **134**. p. 744.
- Murray E. D. G., Webb R. A. and Swann M. B. R. (1926). A Disease of Rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Path. Bacteriol.* **28**. p. 407.
- Nero. L- A., de Mattos M. R., de Aguiar F- B- M., Betoti V. and de Meto Franco.B- D- G. (2009). Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* detection. *Microbiol. Res.* **164** : 529- 535.
- Norme internationale ISO 11290-1 :1996. Partie 1 : Recherche de *Listeria* dans les denrées alimentaires. [En ligne]. http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail.htm?csnumber=19268. (Consulté le 23/11/2010).
- Pirie J. H. H. (1927). A New Disease of veld rodents, “Tiger River Disease”. *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.* **3**. p.163.
- Pirie J. H. H. (1940). *Listeria*. Change of name for a genus of bacteria. *Nature.* **145**. p. 264.
- Poncet S. (1973). Taxonomie numérique du genre *Kluyveromyces*. *Mycopathol. Mycol.* **56** : 267- 281.
- Portalier V. (2002). *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers, étude bibliographique : Thèse de Doctorat. Université de Claude-Bernard – Lyon I (médecine – pharmacie). 168 p.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. *et al* (2003). Microbiologie. 2^{ème} édition. Boeck Université. ISBN : 968- 2 -8041- 4256- 8. 1099 p.

- Réne- Chaume.R. (1975). Les méthodes de taxonomie numérique, *Boissiera* .**24**: 369- 381.
- Ryser E. T. and Marth E.H. (1991). *Listeria*, Listeriosis and food safety. 2^{ème} édition. Manuel ekker. New-York. Inc. 642 p.
- Rodriguez- Lázaro D., Lombard B., Smith H., Rzezutka A., D'Agostino M., Helmuth R. *et al.* (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends Food Sci. Technol.* **18**: 306- 319.
- Rocourt J. and Bille J. (1997). Food borne Listérioses. Rapport trimestriel des statistiques sanitaires mondiales. **50** : 67- 73.
- Rocourt J. (2000). *Listeria* et Listériose : Position phylogénétique et Classification du genre *Listeria* .*Précis de bactériologie clinique.* **46** : 943- 952.
- Rocourt.J. (2002). Analyse du risque *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à consommer .Cours national d'Hygiène et de Microbiologie des Aliment.IPA Alger. p. 1-62.
- Rocourt J., Ben Embarek P., Toyofuku H.and Schlundt J. (2003). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready - to - eat food: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35** (3): 263- 267.
- Soriano J. M., Rico H., Molto J. C., et Manes J. (2001). *Listeria* species in raw and ready to eat foods from restaurants. *J. foods protection.* **64** (4): 551- 553.
- Saitou N. et Nei M.(1987). The Neighbor- joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4** (4) : 406- 425.
- Sanna M. (1994). Listeriose et contamination du lait et des produits bdérivés du lait. *Point Vét.* **26** : 69- 78.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P., Kampfer, P., Maiden, M., *et al* (2000). Report of the ad hoc committee for the reevaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1043-1047.
- Sokal R .R. et Sneath P. H. (1963). Principe of numerical taxonomy. Freeman and company .San Francisco - London. 359 p.

- Statistica 6.0. [En ligne]. <http://software.informer.com/getfree-statistica-6.0/>. (Consulté en Mars 2010).

- Vanegas M. C., Vásquez E., Martínez A. J. and Rueda A. M. (2009). Detection of *Listeria monocytogenes* from raw whole milk for human consumption in Colombia by real- time PCR. *Food Control*. **20**: 430- 432.

- Van Kessel J. S., Karns J. S., Gorski I., McCluskey B. J. and Perdue M. L.(2005). Prevalence of Salmonellae, *Listeria monocytogenes*, and Fecal Coliforms in Bulk Tank Milk on USA dairies. *J. dairy Sci.* **88** (10): 3475- 3479.

- Vardar-Ünlü G., Ünlü M. and bakici M. Z. (1998). Incidence of *Listeria spp.* from raw milk in sivas. *J. Med. Sci.* **28**: 389- 392.

- Wagner M. and McLauchlin J. (2008). Handbook of *Listeria monocytogenes* : Biology. CRC Press. Boca Raton. Floride. USA. ISBN: 13- 978-1 - 4200-5140-7. p. 3-25.

- Watkins J. et Sleath K. P.(1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage and sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 1- 9.

- Wayen G., Bernner, D., J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky; M. *et al* (1987). Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematic . *Int. J .Syst. Microbiol.* **37**: 463- 464.

Annexes

Annexe 1 : Milieux de culture

Gélose Columbia

Usage : milieu d'isolement base de la gélose au sang

Composition :

Mélange spécial de peptones	2 3,0 g
Amidon	1,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	10,0 g
pH = 7,3	

Préparation :

42,5g par litre. Stérilisation classique

Mox (Gélose Oxford modifiée au moxalactam)

Usage : Isolement sélectif des *Listeria*

Composition :

Gélose Columbia modifiée	38,1 g
Esculine	1,0 g
Citrate de fer III ammoniacal	0, 50 g
Colistine	0,01 g
Moxalactam	0,02 g
Chlorure de lithium	15,00 g
pH = 7,2	

Préparation :

55,5 g de poudre par litre. Autoclavage classique.

Annexe 2 : La classification bacterienne du phyla “*Proteobacteria*” : Class “*Gammaproteobacteria*” et “*Firmicutes*” (Garrity et al, 2007).

Domain *Bacteria*^{VP}

Genus XVII. *Thiococcus*^{VP}
 Genus XVIII. *Thiocystis*
 Genus XIX. *Thiodictyon*^{AL}
 Genus XX. *Thioflavococcus*^{VP}
 Genus XXI. *Thiohalocapsa*^{VP}
 Genus XXII. *Thiolamprovum*^{VP}
 Genus XXIII. *Thiopedia*^{AL}
 Genus XXIV. *Thiorhodococcus*^{VP}
 Genus XXV. *Thiorhodovibrio*^{VP}
 Genus XXVI. *Thiospirillum*^{AL}
 Family II. *Ectothiorhodospiraceae*^{VP}
 Genus I. *Ectothiorhodospira*^{AL}
 Genus II. *Alcalilimnicola*^{VP}
 Genus III. *Alkalispirillum*^{VP}
 Genus IV. *Arhodomonas*^{VP}
 Genus V. *Halorhodospira*^{VP}
 Genus VI. *Nitrococcus*^{AL}
 Genus VII. *Thioalkalispira*^{VP}
 Genus VIII. *Thioalkalivibrio*^{VP}
 Genus IX. *Thiorhodospira*^{VP}
 Family III. “*Halothiobacillaceae*”^{NP}
 Genus I. *Halothiobacillus*^{VP(T)}
 Order II. “*Acidithiobacillales*”^{NP}
 Family I. “*Acidithiobacillaceae*”^{NP}
 Genus I. *Acidithiobacillus*^{VP(T)}
 Family II. “*Thermithiobacillaceae*”^{NP}
 Genus I. *Thermithiobacillus*^{VP(T)}
 Order III. “*Xanthomonadales*”^{NP}
 Family I. “*Xanthomonadaceae*”^{NP}
 Genus I. *Xanthomonas*^{AL(T)}
 Genus II. *Frateuria*^{VP}
 Genus III. *Fulvimonas*^{VP}
 Genus IV. *Luteimonas*^{VP}
 Genus V. *Lysobacter*^{AL}
 Genus VI. *Nevskia*^{AL}
 Genus VII. *Pseudoxanthomonas*^{VP}
 Genus VIII. *Rhodanobacter*^{VP}
 Genus IX. *Schineria*^{VP}
 Genus X. *Stenotrophomonas*^{VP}
 Genus XI. *Thermomonas*^{VP}
 Genus XII. *Xylella*^{VP}
 Order IV. “*Cardiobacteriales*”^{NP}
 Family I. *Cardiobacteriaceae*^{VP}
 Genus I. *Cardiobacterium*^{AL(T)}

Phylum BI. *Aquificae*^{VP}

Phylum BII. *Thermotogae*^{VP}

Phylum BIII. *Thermodesulfobacteria*^{VP}

Phylum BIV. *Deinococcus-Thermus*^{VP}

Phylum BV. *Chrysiogenetes*^{VP}

Phylum BVI. “*Chloroflexi*”
 Phylum BVII. *Thermomicrobia*^{VP}

Phylum BVIII. “*Nitrospira*”

Phylum BIX. *Deferribacteres*^{VP}

Phylum BX. *Cyanobacteria*

Phylum BXI. *Chlorobi*^{VP}

Phylum BXII. *Proteobacteria*^{NP}

Class I. “*Alphaproteobacteria*”^{NP}

Class II. “*Betaproteobacteria*”^{NP}

Class III. “*Gammaproteobacteria*”^{NP}

Order I. “*Chromatiales*”^{NP(T)}

Family I. *Chromatiaceae*^{AL}

Genus I. *Chromatium*^{AL(T)}

Genus II. *Allochromatium*^{VP}

Genus III. *Amoebobacter*^{AL}

Genus IV. *Halochromatium*^{VP}

Genus V. *Isochromatium*^{VP}

Genus VI. *Lamprobacter*^{VP}

Genus VII. *Lamprocystis*^{AL}

Genus VIII. *Marichromatium*^{VP}

Genus IX. *Nitrosococcus*^{AL}

Genus X. *Pfennigia*^{VP}

Genus XI. *Rhabdochromatium*^{VP}

Genus XII. *Rheinheimera*^{VP}

Genus XIII. *Thermochromatium*^{VP}

Genus XIV. *Thioalkalicoccus*^{VP}

Genus XV. *Thiobaca*^{VP}

Genus XVI. *Thiocapsa*^{AL}

- Genus II. *Carnimonas*^{VP}
 Genus III. *Chromohalobacter*^{VP}
 Genus IV. *Cobetia*^{VP}
 Genus V. *Deleya*^{VP}
 Genus VI. *Zymobacter*^{VP}
 Family V. *Oleiphilaceae*^{VP}
 Genus I. *Oleiphilus*^{VP(T)}
 Family VI. “*Saccharospirillaceae*”^{NP}
 Genus I. *Saccharospirillum*^{VP(T)}
Order IX. *Pseudomonadales*^{AL}
 Family I. *Pseudomonadaceae*^{AL}
 Genus I. *Pseudomonas*^{AL(T)}
 Genus II. *Azomonas*^{AL}
 Genus III. *Azotobacter*^{AL}
 Genus IV. *Cellvibrio*^{VP}
 Genus V. *Chryseomonas*^{VP}
 Genus VI. *Flavimonas*^{VP}
 Genus VII. *Mesophilobacter*^{VP}
 Genus VIII. *Rhizobacter*^{VP}
 Genus IX. *Rugamonas*^{VP}
 Genus X. *Serpens*^{AL}
 Family II. *Moraxellaceae*^{VP}
 Genus I. *Moraxella*^{AL(T)}
 Genus II. *Acinetobacter*^{AL}
 Genus III. *Enhydrobacter*^{VP}
 Genus IV. *Psychrobacter*^{VP}
Order X. “*Alteromonadales*”
 Family I. *Alteromonadaceae*^{VP}
 Genus I. *Alteromonas*^{AL(T)}
 Genus II. *Alishewanella*^{VP}
 Genus III. *Colwellia*^{VP}
 Genus IV. *Ferrimonas*^{VP}
 Genus V. *Glaciecola*^{VP}
 Genus VI. *Idiomarina*^{VP}
 Genus VII. *Marinobacter*^{VP}
 Genus VIII. *Marinobacterium*^{VP}
 Genus IX. *Microbulbifer*^{VP}
 Genus X. *Moritella*^{VP}
 Genus XI. *Pseudoalteromonas*^{VP}
 Genus XII. *Psychromonas*^{VP}
 Genus XIII. *Shewanella*^{VP}
 Genus XIV. *Thalassomonas*^{VP}
 Family II. *Incertae sedis*
 Genus I. *Teredinibacter*^{VP}
Order XI. “*Vibrionales*”^{NP}
 Family I. *Vibrionaceae*^{AL}
 Genus I. *Vibrio*^{AL(T)}
 Genus II. *Allomonas*^{VP}
 Genus III. *Catenococcus*^{VP}
 Genus IV. *Enterovibrio*^{VP}
 Genus V. *Grimontia*^{VP}
 Genus VI. *Listonella*^{VP}
 Genus VII. *Photobacterium*^{AL}
 Genus II. *Dichelobacter*^{VP}
 Genus III. *Suttonella*^{VP}
Order V. “*Thiotrichales*”^{NP}
 Family I. “*Thiotrichaceae*”^{NP}
 Genus I. *Thiothrix*^{AL(T)}
 Genus II. *Achromatium*^{AL}
 Genus III. *Beggiatoa*^{AL}
 Genus IV. *Leucothrix*^{AL}
 Genus V. *Thiobacterium*^{VP}
 Genus VII. *Thioploca*^{AL}
 Genus VIII. *Thiospira*^{AL}
 Family II. “*Piscirickettsiaceae*”^{NP}
 Genus I. *Piscirickettsia*^{VP(T)}
 Genus II. *Cycloclasticus*
 Genus III. *Hydrogenovibrio*^{VP}
 Genus IV. *Methylophaga*^{VP}
 Genus V. *Thioalkalimicrobium*^{VP}
 Genus VI. *Thiomicrospira*^{AL}
 Family III. “*Francisellaceae*”^{NP}
 Genus I. *Francisella*^{AL(T)}
Order VI. “*Legionellales*”^{NP}
 Family I. *Legionellaceae*^{AL}
 Genus I. *Legionella*^{AL(T)}
 Family II. “*Coxiellaceae*”^{NP}
 Genus I. *Coxiella*^{AL(T)}
 Genus II. *Rickettsiella*^{AL}
Order VII. “*Methylococcales*”^{NP}
 Family I. *Methylococcaceae*^{VP}
 Genus I. *Methylococcus*^{AL(T)}
 Genus II. *Methylobacter*^{VP}
 Genus III. *Methylocaldum*^{VP}
 Genus IV. *Methylomicrobium*^{VP}
 Genus V. *Methylomonas*^{VP}
 Genus VI. *Methylosarcina*^{VP}
 Genus VII. *Methylosphaera*^{VP}
Order VIII. “*Oceanospirillales*”^{NP}
 Family I. “*Oceanospirillaceae*”^{NP}
 Genus I. *Oceanospirillum*^{AL(T)}
 Genus II. *Balneatrix*^{VP}
 Genus III. *Marinomonas*^{VP}
 Genus IV. *Marinospirillum*^{VP}
 Genus V. *Neptunomonas*^{VP}
 Genus VI. *Oceanobacter*^{VP}
 Genus VII. *Oleispira*^{VP}
 Genus VIII. *Pseudospirillum*^{VP}
 Family II. “*Alcanivoraceae*”^{NP}
 Genus I. *Alcanivorax*^{VP(T)}
 Genus II. *Fundibacter*^{VP}
 Family III. “*Hahellaceae*”^{NP}
 Genus I. *Hahella*^{VP(T)}
 Genus II. *Zooshikella*^{VP}
 Family IV. *Halomonadaceae*^{VP}
 Genus I. *Halomonas*^{VP(T)}

Genus XLI. *Wigglesworthia* VP

Genus XLII. *Xenorhabdus* AL

Genus XLIII. *Yersinia* AL

Genus XLIV. *Yokenella* VP

Order XIV. “Pasteurellales” NP

Family I. *Pasteurellaceae* VP

Genus I. *Pasteurella* AL (T)

Genus II. *Actinobacillus* AL

Genus III. *Gallibacterium* VP

Genus IV. *Haemophilus* AL

Genus V. *Lonepinella* VP

Genus VI. *Mannheimia* VP

Genus VII. *Phocoenobacter* VP

Class IV. “Deltaproteobacteria” NP

Class V. “Epsilonproteobacteria” NP

Phylum BXIII. “Firmicutes”

Class I. “Clostridia”

Order I. *Clostridiales* AL

Family I. *Clostridiaceae* AL

Genus I. *Clostridium* AL (T)

Genus II. *Acetivibrio* VP

Genus III. *Acidaminobacter* VP

Genus IV. *Alkaliphilus* VP

Genus V. *Anaerobacter* VP

Genus VI. *Camnicella* VP

Genus VII. *Caloramator* VP

Genus VIII. *Caloranaerobacter* VP

Genus IX. *Coprobaecillus* VP

Genus X. *Dorea* VP

Genus XI. *Faecalibacterium* VP

Genus XII. *Natronincola* VP

Genus XIII. *Oxobacter* VP

Genus XIV. *Sarcina* AL

Genus XV. *Sporobacter* VP

Genus XVI. *Tepidibacter* VP

Genus XVII. *Thermobrachium* VP

Genus XVIII. *Thermohalobacter* VP

Genus XIX. *Tindallia* VP

Family II. “*Lachnospiraceae*”

Genus I. *Lachnospira* AL

Genus II. *Acetitomaculum* VP

Genus III. *Anaerofilum* VP

Genus IV. *Anaerostipes* VP

Genus V. *Butyrivibrio* AL

Genus VI. *Catenibacterium* VP

Genus VII. *Catonella* VP

Genus VIII. *Coprococcus* AL

Genus IX. *Johnsonella* VP

Genus X. *Lachnobacterium* VP

Genus XI. *Pseudobutyrvibrio* VP

Genus XII. *Roseburia*

Genus XIII. *Ruminococcus* AL

Genus VIII. *Salinivibrio* VP

Order XII. “Aeromonadales” NP

Family I. *Aeromonadaceae* VP

Genus I. *Aeromonas* AL (T)

Genus II. *Oceanimonas* VP

Genus III. *Tolumonas* VP

Family II. *Succinivibrionaceae* VP

Genus I. *Succinivibrio* AL (T)

Genus II. *Anaerobiospirillum* AL

Genus III. *Ruminobacter* VP

Genus IV. *Succinimonas* VP

Order XIII. “Enterobacteriales” NP

Family I. *Enterobacteriaceae* AL

Genus I. *Escherichia* AL (T)

Genus II. *Alterococcus* VP

Genus III. *Arsenophonus* VP

Genus IV. *Brenneria* VP

Genus V. *Buchnera* VP

Genus VI. *Budvicia* VP

Genus VII. *Buttiauxella* VP

Genus VIII. *Calymmatobacterium* VP

Genus IX. *Cedecea* VP

Genus X. *Citrobacter* AL

Genus XI. *Edwardsiella* AL

Genus XII. *Enterobacter* AL

Genus XIII. *Erwinia* AL

Genus XIV. *Ewingella* VP

Genus XV. *Hafnia* AL

Genus XVI. *Klebsiella* AL

Genus XVII. *Kluyvera* VP

Genus XVIII. *Leclercia* VP

Genus XIX. *Leminorella* VP

Genus XX. *Moellerella* VP

Genus XXI. *Morganella* AL

Genus XXII. *Obesumbacterium* AL

Genus XXIII. *Pantoea* VP

Genus XXIV. *Pectobacterium* AL

Genus XXV. “*Phlomobacter*”

Genus XXVI. *Photorhabdus* VP

Genus XXVII. *Plesiomonas* AL

Genus XXVIII. *Pragia* VP

Genus XXIX. *Proteus* AL

Genus XXX. *Providencia* AL

Genus XXXI. *Rahnella* VP

Genus XXXII. *Raoultella* VP

Genus XXXIII. *Saccharobacter* VP

Genus XXXIV. *Salmonella* AL

Genus XXXV. *Samsonia* VP

Genus XXXVI. *Serratia* AL

Genus XXXVII. *Shigella* AL

Genus XXXVIII. *Sodalis* VP

Genus XXXIX. *Tatumella* VP

Genus XL. *Trabulsiella* VP

Genus XVI. *Phascolarctobacterium* VP
 Genus XVII. *Propionispira* VP
 Genus XVIII. *Propionispora* VP
 Genus XIX. *Quinella* VP
 Genus XX. *Schwartzia* VP
 Genus XXI. *Selenomonas* AL
 Genus XXII. *Sporomusa* VP
 Genus XXIII. *Succiniclasticum* VP
 Genus XXIV. *Succinispira* VP
 Genus XXV. *Veillonella* AL
 Genus XXVI. *Zymophilus* VP

Family VIII. *Syntrophomonadaceae* VP

Genus I. *Syntrophomonas*^{VP(T)}
 Genus II. *Acetogenium*^{VP}
 Genus III. *Aminobacterium*^{VP}
 Genus IV. *Aminomonas*^{VP}
 Genus V. *Anaerobaculum*^{VP}
 Genus VI. *Anaerobranca*^{VP}
 Genus VII. *Caldicellulosiruptor*^{VP}
 Genus VIII. *Carboxydocella*^{VP}
 Genus IX. *Dethiosulfovibrio*^{VP}
 Genus X. *Pelospora*^{VP}
 Genus XI. *Syntrophospora*^{VP}
 Genus XII. *Syntrophothermus*^{VP}
 Genus XIII. *Thermaerobacter*^{VP}
 Genus XIV. *Thermanaerovibrio*^{VP}
 Genus XV. *Thermohydrogenium*^{VP}
 Genus XVI. *Thermosyntropha*^{VP}

Order II. “Thermoanaerobacteriales”

Family I. “*Thermoanaerobacteriaceae*”

Genus I. *Thermoanaerobacterium*^{VP}
 Genus II. *Ammonifex*^{VP}
 Genus III. *Carboxydibrachium*^{VP}
 Genus IV. *Coprothermobacter*^{VP}
 Genus V. *Gelria*^{VP}
 Genus VI. *Moorella*^{VP}
 Genus VII. *Sporotomaculum*^{VP}
 Genus VIII. *Thermacetogenium*^{VP}
 Genus IX. *Thermanaeromonas*^{VP}
 Genus X. *Thermoanaerobacter*^{VP}
 Genus XI. *Thermoanaerobium*^{VP}
 Genus XII. *Thermovenabulum*^{VP}

Order III. *Halanaerobiales*^{VP}

Family I. *Halanaerobiaceae*^{VP}

Genus I. *Halanaerobium*^{VP(T)}
 Genus II. *Halocella*^{VP}
 Genus III. *Halothermothrix*^{VP}

Family II. *Halobacteroidaceae*^{VP}

Genus I. *Halobacteroides*^{VP(T)}
 Genus II. *Acetohalobium*^{VP}
 Genus III. *Halanaerobacter*^{VP}
 Genus IV. *Halonatronum*^{VP}
 Genus V. *Natroniella*^{VP}

Genus XIV. *Shuttleworthia* VP

Genus XV. *Sporobacterium* VP

Family III. “*Peptostreptococcaceae*”

Genus I. *Peptostreptococcus* AL
 Genus II. *Anaerococcus* VP
 Genus III. *Filifactor* VP
 Genus IV. *Finegoldia* VP
 Genus V. *Fusibacter* VP
 Genus VI. *Gallicola* VP
 Genus VII. *Helcococcus* VP
 Genus VIII. *Micromonas* VP
 Genus IX. *Peptoniphilus* VP
 Genus X. *Sedimentibacter* VP
 Genus XI. *Sporanaerobacter* VP
 Genus XII. *Tissierella* VP

Family IV. “*Eubacteriaceae*”

Genus I. *Eubacterium*^{AL}
 Genus II. *Acetobacterium*^{AL}
 Genus III. *Anaerovorax*^{VP}
 Genus IV. *Mogibacterium*^{VP}
 Genus V. *Pseudoramibacter*^{VP}

Family V. *Peptococcaceae*^{AL}

Genus I. *Peptococcus*^{AL(T)}
 Genus II. *Carboxydothemus*^{VP}
 Genus III. *Dehalobacter*^{VP}
 Genus IV. *Desulfitobacterium*^{VP}
 Genus V. *Desulfonispora*^{VP}
 Genus VI. *Desulfosporosinus*^{VP}
 Genus VII. *Desulfotomaculum*^{AL}
 Genus VIII. *Pelotomaculum*^{VP}
 Genus IX. *Syntrophobotulus*^{VP}
 Genus X. *Thermoterrabacterium*^{VP}

Family VI. “*Heliobacteriaceae*”

Genus I. *Heliobacterium*^{VP}
 Genus II. *Heliobacillus*^{VP}
 Genus III. *Heliophilum*^{VP}
 Genus IV. *Heliorestis*^{VP}

Family VII. “*Acidaminococcaceae*”

Genus I. *Acidaminococcus*^{AL}
 Genus II. *Acetonema*^{VP}
 Genus III. *Allisonella*^{VP}
 Genus IV. *Anaeroarcus*^{VP}
 Genus V. *Anaeroglobus* VP
 Genus VI. *Anaeromusa* VP
 Genus VII. *Anaerosinus* VP
 Genus VIII. *Anaerovibrio* AL
 Genus IX. *Centipeda* VP
 Genus X. *Dendrosporobacter* VP
 Genus XI. *Dialister* VP
 Genus XII. *Megasphaera* AL
 Genus XIII. *Mitsuokella* VP
 Genus XIV. *Papillibacter* VP
 Genus XV. *Pectinatus* AL

Genus XXII. *Ureibacillus*^{VP}
 Genus XXIII. *Virgibacillus*^{VP}
 Family II. “*Alicyclobacillaceae*”
 Genus I. *Alicyclobacillus*^{VP}
 Genus II. *Pasteuria*^{AL}
 Genus III. *Sulfobacillus*^{VP}
 Family III. *Caryophanaceae*^{AL}
 Genus I. *Caryophanon*^{AL(T)}
 Family IV. “*Listeriaceae*”
 Genus I. *Listeria*^{AL}
 Family V. “*Paenibacillaceae*”
 Genus I. *Paenibacillus*^{VP}
 Genus II. *Ammoniphilus*^{VP}
 Genus III. *Aneurinibacillus*^{VP}
 Genus IV. *Brevibacillus*^{VP}
 Genus V. *Oxalophagus*^{VP}
 Genus VI. *Thermicanus*^{VP}
 Genus VII. *Thermobacillus*^{VP}
 Family VI. *Planococcaceae*^{AL}
 Genus I. *Planococcus*^{AL(T)}
 Genus II. *Filibacter*^{VP}
 Genus III. *Kurthia*^{AL}
 Genus IV. *Planomicrobium*^{VP}
 Genus V. *Sporosarcina*^{AL}
 Family VII. “*Sporolactobacillaceae*”
 Genus I. *Sporolactobacillus*^{AL}
 Genus II. *Marinococcus*^{VP}
 Genus III. *Sinococcus*^{VP}
 Family VIII. “*Staphylococcaceae*”
 Genus I. *Staphylococcus*^{AL}
 Genus II. *Gemella*^{AL}
 Genus III. *Jeotgalicoccus*^{VP}
 Genus IV. *Macrococcus*^{VP}
 Genus V. *Salinicoccus*^{VP}
 Family IX. “*Thermoactinomycetaceae*”
 Genus I. *Thermoactinomyces*^{AL}
 Genus II. *Laceyella*^{VP}
 Genus III. *Planifilum*^{VP}
 Genus IV. *Seinonella*^{VP}
 Genus V. *Thermoflavimicrobium*^{VP}
 Family X. “*Turicibacteraceae*”
 Genus I. *Turicibacter*^{VP(T)}
Order II. “*Lactobacillales*”
 Family I. *Lactobacillaceae*^{AL}
 Genus I. *Lactobacillus*^{AL(T)}
 Genus II. *Paralactobacillus*^{VP}
 Genus III. *Pediococcus*^{AL}
 Family II. “*Aerococcaceae*”
 Genus I. *Aerococcus*^{AL}
 Genus II. *Abiotrophia*^{VP}
 Genus III. *Dolosicoccus*^{VP}
 Genus IV. *Eremococcus*^{VP}
 Genus V. *Facklamia*^{VP}

Genus VI. *Orenia*^{VP}
 Genus VII. *Selenihalanaerobacter*^{VP}
 Genus VIII. *Sporohalobacter*^{VP}
Class II. *Mollicutes* AL
 Order I. *Mycoplasmatales* AL(T)
 Family I. *Mycoplasmataceae*^{AL}
 Genus I. *Mycoplasma*^{AL(T)}
 Genus II. *Eperythrozoon*^{AL}
 Genus III. *Haemobartonella*^{AL}
 Genus IV. *Ureaplasma*^{AL}
 Order II. *Entomoplasmatales* VP
 Family I. *Entomoplasmataceae*^{VP}
 Genus I. *Entomoplasma*^{VP(T)}
 Genus II. *Mesoplasma*^{VP}
 Family II. *Spiroplasmataceae*^{VP}
 Genus I. *Spiroplasma*^{AL(T)}
 Order III. *Acholeplasmatales* VP
 Family I. *Acholeplasmataceae*^{AL}
 Genus I. *Acholeplasma*^{AL}
 Order IV. *Anaeroplasmatales* VP
 Family I. *Anaeroplasmataceae*^{VP}
 Genus I. *Anaeroplasma*^{AL(T)}
 Genus II. *Asteroleplasma*^{VP}
 Order V. *Incertae sedis* 9
 Family I. “*Erysipelotrichaceae*”
 Genus I. *Erysipelothrix* AL
 Genus II. *Bulleidia*^{VP}
 Genus III. *Holdemania*^{VP}
 Genus IV. *Solobacterium*^{VP}
Class III. “*Bacilli*”
 Order I. *Bacillales* AL
 Family I. *Bacillaceae*^{AL}
 Genus I. *Bacillus*^{AL(T)}
 Genus II. *Alkalibacillus*^{VP}
 Genus III. *Amphibacillus*^{VP}
 Genus IV. *Anoxybacillus*^{VP}
 Genus V. *Caldalkalibacillus*^{VP}
 Genus VI. *Cerasibacillus*^{VP}
 Genus VII. *Exiguobacterium*^{VP}
 Genus VIII. *Filobacillus*^{VP}
 Genus IX. *Geobacillus*^{VP}
 Genus X. *Gracilibacillus*^{VP}
 Genus XI. *Halobacillus*^{VP}
 Genus XII. *Jeotgalibacillus*^{VP}
 Genus XIII. *Lentibacillus*^{VP}
 Genus XIV. *Marinibacillus*^{VP}
 Genus XV. *Oceanobacillus*^{VP}
 Genus XVI. *Ornithinibacillus*^{VP}
 Genus XVII. *Paraliobacillus*^{VP}
 Genus XVIII. *Paucisalibacillus*^{VP}
 Genus XIX. *Ponctibacillus*^{VP}
 Genus XX. *Saccharococcus*^{VP}
 Genus XXI. *Salinibacillus*^{VP}

Family VII. *Incertae sedis*
 Genus I. *Acetoanaerobium*^{VP}
 Genus II. *Oscillospira* AL
 Genus III. *Syntrophococcus*^{VP}
 Genus IV. *Symbiobacterium*^{VP}

Phylum BXIV. “Actinobacteria”^{NP}

Phylum BXV. “Planctomycetes”

Phylum BXVI. “Chlamydiae”

Phylum BXVII. “Spirochaetes”^{NP}

Phylum BXVIII. “Fibrobacteres”

Phylum BXIX. “Acidobacteria”

Phylum BXX. “Bacteroidetes”

Phylum BXXI. “Fusobacteria”

Phylum BXXII. “Verrucomicrobia”

Phylum BXXIII. “Dictyoglomi”

Phylum BXXIV. Gemmatimonadetes^{VP}
 AL – Listes approuvées, VP – validement publiés,
 NP – nouvelles propositions apparaissant dans le
 volume 2 du “*Bergey’s Manual of Systematic
 Bacteriology*“, 2ème Edition

Genus VI. *Globicatella*^{VP}
 Genus VII. *Ignavigranum*^{VP}

Family III. “*Carnobacteriaceae*”

Genus I. *Carnobacterium*^{VP}
 Genus II. *Agitococcus*^{VP}
 Genus III. *Alkalibacterium*^{VP}
 Genus IV. *Allofustis*^{VP}
 Genus V. *Alloiococcus*^{VP}
 Genus VI. *Atopococcus*^{VP}
 Genus VII. *Atopostipes*^{VP}
 Genus VIII. *Desemzia*^{VP}
 Genus IX. *Dolosigranulum*^{VP}
 Genus X. *Granulicatella*^{VP}
 Genus XI. *Isobaculum*^{VP}
 Genus XII. *Marinilactibacillus*^{VP}
 Genus XIII. *Trichococcus*^{VP}

Family IV. “*Enterococcaceae*”

Genus I. *Enterococcus*^{VP}
 Genus II. *Atopobacter*^{VP}
 Genus III. *Catelicoccus*^{VP}
 Genus IV. *Melissococcus*^{VP}
 Genus V. *Tetragenococcus*^{VP}
 Genus VI. *Vagococcus*^{VP}

Family V. “*Leuconostocaceae*”

Genus I. *Leuconostoc*^{AL}
 Genus II. *Oenococcus*^{VP}
 Genus III. *Weissella*^{VP}

Family VI. *Streptococcaceae*^{AL}

Genus I. *Streptococcus*^{AL(T)}
 Genus II. *Lactococcus*^{VP}
 Genus III. *Lactovum*^{VP}

Annexe 3

Lexique

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 nœud, 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".

Nœud : 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.

Phénétique:

- 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 nœud 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.

Abstract

61 strains of bacteria were isolated from 70 samples of raw milk from cows which belong to two different regions: Constantine and Mila. They were identified by conventional methods. The enumeration of the FTAM showed good microbiological quality of raw milk analyzed. Among the 61 isolates, four strains (5.71%) were identified by their morphological, physiological and biochemical characteristics, as belong to the genus *Listaria* including three from the region of Constantine and one from the region of Mila and 57 strains (94.29%) belong to the genera: *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Pediococcus*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Lactococcus*.

A phylogeny was conducted from the aggregate of strains, it was done by the distance method, using two algorithms UPGMA and NJ. The analysis of topologies obtained permits to specify the nature of the relationship between taxonomic *Listeria spp* and other stains .

Key words: *Listeria.spp*, numerical taxonomy, phylogenetic tree.

الملخص:

تم عزل 61 سلالة بكتيرية من أصل 70 عينة من حليب الأبقار الخام لمنطقتين مختلفتين : قسنطينة وميلة. حيث حددت بالطرق الاصطلاحية. وأظهر تعداد مجموع السلالات البكتيرية الهوائية المتوسطة الحرارة جودة ميكروبيولوجية جيدة لعينات الحليب الخام المدروسة. أربع سلالات (5.71 %) من بين 61 عذلة عرفت من خلال دراسة خصائصها المورفولوجية والفسولوجية والبيوكيميائية و كشف انتماءها إلى جنس *Listaria* منها ثلاثة من منطقة قسنطينة . 57 سلالة الباقية (94.29 %) صنفت ضمن الأجناس: *Bacillus* ، *Acenetobacter* ، *Enterococcus* ، *Pediococcus* ، *Escherichia* ، *Leuconostoc* ، *Streptococcus* ، *Staphylococcus* ، *Lactobacillus* ، *Lactococcus* ، *Proteus* ، *Salmonella* ، *Citrobacter* .

بالإعتماد على مجموع السلالات المعزولة أنشأت شجرة التطور الوراثي بطريقة حساب الإختلافات وذلك باستخدام الخوارزميين UPGMA و NJ . الطوبولوجيا المتحصل عليها تحدد طبيعة العلاقة التصنيفية بين *Listaria* و باقي السلالات.

كلمات البحث : *Listeria.spp* ، التصنيف العددي ، شجرة النشوء والتطور الوراثي.

Nom : KAOUACHE

Prénom : Saliha

Date de soutenance : 19/01/2011

Titre : Evaluation et taxonomie numérique de la flore *Listeria spp.* dans un environnement d'élevage bovin

Résumé

61 souches bactériennes ont été isolées à partir de 70 échantillons de lait cru de vaches appartenant à deux régions différentes : Constantine et Mila. Elles ont été identifiées par les méthodes conventionnelles. Le dénombrement de la FTAM a montré une bonne qualité microbiologique des laits crus analysés. Parmi les 61 isolats, quatre souches (5,71 %) ont été identifiées présomptivement. Selon leurs caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques, ces quatre souches appartiendraient au genre *Listaria*. Trois d'entre elles proviennent de la région de Constantine. Les autres 57 souches restantes (94,29%) appartiennent aux genres : *Enterococcus*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Escherichia*, *Pediococcus*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Lactococcus*.

Une phylogénie a été effectuée sur l'ensemble des souches isolées. Elle a été réalisée par la méthode de distances, en utilisant deux algorithmes UPGMA et NJ. L'analyse des topologies obtenues a permis de préciser la nature des liens taxonomiques entre *Listeria spp.* et le reste de la microflore.

Mots clés : *Listeria.spp.*, Taxonomie Numérique, Arbre phylogénétique.

Laboratoire de recherche

Laboratoire de Microbiologie. Département de Biochimie-Microbiologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri Constantine.

Membre du jury :

Président : Benguedouar A. Professeur Université Mentouri Constantine

Rapporteur : Hamidechi M.A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine

Examineurs : Boudemagh A. Maître de conférences Université Mentouri Constantine

Kitouni M. Maître de conférences Université Mentouri Constantine

Benhizia Y. Maître de conférences Université Mentouri Constantine