



HAL
open science

**Incidence de la salmonella et de la listeria
monocytogènes dans les denrées alimentaires: bilan
analytique sur cinq ans au Laboratoire Vétérinaire et
ALimentaire Départemental de Meurthe-et-Moselle
(LVAD 54)**

David Coupin

► **To cite this version:**

David Coupin. Incidence de la salmonella et de la listeria monocytogènes dans les denrées alimentaires: bilan analytique sur cinq ans au Laboratoire Vétérinaire et ALimentaire Départemental de Meurthe-et-Moselle (LVAD 54). Sciences pharmaceutiques. 2008. hal-01733586

HAL Id: hal-01733586

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733586>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2008

FACULTE DE PHARMACIE

**INCIDENCE DE SALMONELLA ET LISTERIA
MONOCYTOGENES DANS LES
DENREES ALIMENTAIRES**

**Bilan analytique sur cinq ans au Laboratoire Vétérinaire et Alimentaire
Départemental de Meurthe et Moselle (LVAD 54)**

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 28 mai 2008

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **David COUPIN**

né le 12 septembre 1978 à Essey les Nancy (54)

Membres du Jury

Président : Mme Janine SCHWARTZBROD, Professeur des Universités –
Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : M. Jean-Marie BARADEL, Docteur es Sciences Pharmaceutiques
Directeur de thèse

M. Jacques BARRAT, Docteur Vétérinaire
UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN
Chantal FINANCE
Vice-Doyen
Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie
Pierre LABRUDE
Responsable de la Commission de la Recherche
Jean-Claude BLOCK
Directeur des Etudes
Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales
Janine SCHWARTZBROD
Responsable de la Communication
Francine KEDZIEREWICZ
Responsable de la Commission Hygiène Sécurité
Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine : Gérald CATAU
Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS
Responsable du CEPH : Jean-Michel SIMON
(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON **Professeur Emérite :** Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMAN
Michel JACQUE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
François MORTIER
Maurice PIERFITTE
Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER
Marie-Andrée IMBS
Marie-Hélène LIVERTOUX
Jean-Louis MONAL
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire
Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité)	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON	Pharmacologie
Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et Santé
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
Catherine BOÎTEUX	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA	Physiologie
Gérald CATAU	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Bernard DANGIEN	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique

Florence DUMARCA Y.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD..... Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS..... Bactériologie

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET..... Directeur
Frédérique FERON..... Responsable de la section Pharmacie-
Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A notre présidente de thèse,

Madame Schwartzbrod,

Professeur des universités à la faculté de Pharmacie de Nancy
(Laboratoire de bactériologie – parasitologie)

*Pour avoir accepté de présider ma thèse,
votre accueil courtois et toujours de bon
conseil,
Veuillez recevoir mes remerciements comme
témoignage d'un profond respect.*

A notre directeur de thèse,

Monsieur Baradel,

Docteur es sciences pharmaceutiques,

*Pour le temps passé à m'avoir accompagné
dans ce travail, malgré les nombreux
contretemps, sans jamais baisser les bras,
Pour votre grande disponibilité, votre
gentillesse, et vos bons conseils,
Veuillez accepter à travers cette thèse toute
ma gratitude, et surtout ma plus profonde
considération.*

A notre juge

Monsieur Barrat,

Docteur vétérinaire,

*Pour l'amabilité de bien vouloir siéger parmi
notre jury,
Veuillez acceptez mes remerciements les
plus sincères.*

A mes parents

Pour m'avoir donné une bonne éducation, et m'avoir toujours laissé prendre les orientations que je souhaitais, qu'elles soient professionnelles ou personnelles.

Je vous remercie du soutien que vous m'apportez encore aujourd'hui, j'espère être toujours à la hauteur de vos espérances.

A mon frère Julien

Qui a partagé toute mon enfance, même si la distance nous sépare aujourd'hui, tu pourras toujours compter sur moi, et j'espère pouvoir faire plus ample connaissance avec Sarah.

A mes grands parents

Mamie pour être toujours disponible et pleine d'amour pour tes petits enfants.

Une pensée pour toi papi qui n'aura pas pu assister à ma soutenance, repose en paix.

A mes oncles, tantes, cousin et cousine

J'ai la chance d'avoir une famille unie et sans conflits, j'espère qu'il en restera toujours ainsi.

Merci à tous pour votre accueil toujours chaleureux.

A la famille de Florence

Pour m'avoir accepté avec gentillesse, c'est toujours un plaisir de passer du temps en votre compagnie.

A mes amis de la fac

Zouzou, Camille, Remy, Joey, Jere, Emilien, Seb, Francouille, Pr Dahoo, Vincent, Agathe, Cécile, Delphine.

Je passe toujours d'excellents moments en votre compagnie, la distance sépare certains, mais vous répondez toujours présents pour les grands événements.

A mes amis d'enfance

Tony, Marine et Valentine, Pop's et Steff, Günter et Christelle, les quelques années où nous nous sommes perdu de vue n'ont pas altérées notre complicité.

Aux amis de Florence

Emily et Séb, Christelle et François, Fred, Carmen, pour vos « soirées filles ».
Emilie, Guillaume et le petit Quentin, Charlotte et Gauthier.

A Florence

Qui partage ma vie depuis déjà plus de 6 ans, qui me supporte, qui m'accompagne au jour le jour et qui me motive.

Je te dédie cette thèse, point de passage vers de nouveaux objectifs ensemble.

J'espère que comme moi, ton amour est toujours aussi fort, et que nous mèneront nos projets communs à bien.

A l'avenir ensemble...

SOMMAIRE

Introduction	17
1 Salmonella	19
1.1 Historique	19
1.2 Taxonomie	19
1.2.1 Entérobactérie	20
1.2.2 Caractères différentiels du genre <i>Salmonella</i>	20
1.2.2.1 Caractères biochimiques	20
1.2.2.2 Antigènes	21
1.2.3 Classification actuelle	23
1.3 Pathogénicité	26
1.3.1 Fièvre typhoïde	26
1.3.2 La fièvre paratyphoïde	27
1.3.3 La fièvre entérique ou salmonellose	27
1.3.4 Intoxications alimentaires	28
1.3.5 Épidémiologie	28
1.3.6 Épidémiologie de la fièvre typhoïde	29
1.3.7 Personnes à risque	30
1.3.8 Prévention	30
1.4 Mise en évidence dans les denrées alimentaires	31
1.4.1 Méthode d'enrichissement pour la recherche de <i>Salmonella</i>	31
1.4.2 Détermination du sérotype	33
2 <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.1 Historique	36
2.2 Taxonomie	39
2.2.1 Caractéristiques phénotypiques	39
2.2.2 Identification des espèces de <i>Listeria</i>	41
2.2.3 Sérotype	44
2.3 Pathogénicité	46
2.3.1 Listériose	47
2.3.1.1 Listériose invasive	47
2.3.1.2 Listériose non invasive	48
2.3.1.3 Portage	48
2.3.2 Physiopathologie de la listériose	49
2.3.3 Épidémiologie	50
2.3.4 Dose infectante	53
2.3.5 Traitement	54
2.3.6 Population à risques	55
2.4 Mise en évidence dans les denrées alimentaires	56
2.4.1 Échantillonnage et traitement de l'échantillon	56
2.4.1.1 Contamination	56
2.4.1.2 Traitement de l'échantillon	56
2.4.2 Enrichissement	57
2.4.3 Isolement des <i>Listeria</i> dans les aliments selon la méthode "Rapid'L.Mono"	59
2.4.4 Sérotypage	60

2.4.5 Méthode ISO 11290-2. Dénombrement de <i>Listeria monocytogenes</i> à partir des denrées alimentaires	60
2.4.5.1 Principe.....	60
2.4.5.2 Mode opératoire.....	61
2.4.5.3 Expression des résultats.....	64
2.5 Classification des aliments du point de vue du risque lié a la présence de <i>L. monocytogenes</i>	67
3 Etude statistique et exploitation des résultats	70
3.1 Données relatives à <i>Salmonella</i>	70
3.1.1 Résultats positifs à <i>Salmonella</i>	70
3.1.1.1 Résultats positifs dans les aliments	70
3.1.2 Exploitation des résultats.....	72
3.1.2.1 Sérotypes de <i>Salmonella</i> trouvés.....	74
3.1.2.2 Types d'aliments contaminés	76
3.2 Données relatives à <i>Listeria monocytogenes</i>	79
3.2.1 Résultats positifs à <i>Listeria monocytogenes</i>	79
3.2.1.1 Résultats positifs dans les aliments	79
3.2.1.2 Résultats positifs dans l'environnement de production.....	81
3.2.2 Exploitation des résultats.....	83
3.2.2.1 <i>Listeria</i> dans les aliments	85
3.2.2.2 <i>Listeria</i> dans l'environnement.....	86
3.2.3 Sérotypes de <i>Listeria</i> trouvés.....	88
3.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> d'origine alimentaire. Répartition en fonction des aliments.....	91
3.3 Qu'est ce que le HACCP	94
3.3.1 Définition.....	94
3.3.2 Les 7 principes de l'HACCP	94
3.3.3 Les 12 étapes de l'HACCP	96
3.4 La paquet Hygiène.....	100
3.4.1 Définition.....	100
3.4.2 Un ensemble de textes	100
3.4.3 Les objectifs.....	102
3.4.4 Les moyens	102
Conclusion.....	105
Bibliographie	107
Annexes	113
Annexe 1 : Composition des milieux de culture	113
Annexe 2 : Fiche de déclaration obligatoire de la Listériose	118
Annexe 3 : Fiche de déclaration obligatoire des Toxi-infections alimentaires	119
Annexe 4 : Fiche de renseignement pour sérotypage d'une souche de <i>Listeria</i> envoyée au CNR.	120

INTRODUCTION

Introduction

A l'heure où la sécurité sanitaire des aliments fait encore la une des journaux télévisés français via l'affaire des deux tonnes de steaks hachés contaminés par *E. Coli*, le consommateur est à nouveau dans le doute en ce qui concerne l'intégrité des aliments qu'il consomme. Confiance déjà bien malmenée ces dernières années vu les épidémies relayées à coup de grand renfort médiatique.

Pourtant, les normes de contrôles se multiplient, et il est rare de développer une toxoinfection alimentaire, bien que le risque zéro n'existe pas en sécurité alimentaire.

Notre travail va s'atteler à faire le point sur la présence de deux bactéries dans les aliments, *Salmonella* et *Listeria monocytogenes*.

Quelles sont les caractéristiques bactériologiques et épidémiologiques de ces bactéries ?

Quels sont les risques encourus par le consommateur ?

Comment peut-on les détecter dans les denrées alimentaires ?

Ces questions seront traitées dans les deux premières parties.

Nous terminerons notre travail par l'étude de l'incidence de *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* dans les prélèvements du Laboratoire Vétérinaire et Alimentaire départemental (LVAD) sur la période 2003-2007.

La région de Nancy est-elle une bonne élève en ce qui concerne la sécurité alimentaire ? Les aliments incriminés habituellement sont-ils ceux le plus fréquemment contaminés ?

Un grand nombre de publications déjà existantes traitent des toxoinfections alimentaires, des épidémies, mais très peu sur ce qui se passe en amont, c'est-à-dire la salubrité des aliments en sortie de production, ou sur la chaîne de fabrication, avant qu'il n'y ait incident et risque pour le consommateur.

Nous tâcherons donc d'apporter des réponses avec les données recueillies.

I
SALMONELLA

1 Salmonella

1.1 Historique

Eberth découvre en 1880 l'agent responsable de la fièvre typhoïde dont la culture sera réalisée par Gaffky en 1884. Le genre *Salmonella* a été utilisé en 1886 après que le biologiste américain Daniel Salmon eût isolé une bactérie provenant du porc (maintenant connue comme *Salmonella Choleraesuis*) qui était considérée comme étant la cause de la fièvre porcine (choléra du porc) (Encyclopédie ENCARTA 2004). En 1896, Widal a mis en évidence la diversité antigénique des souches de salmonelles. A ce jour on a isolé plus de 2500 sérotypes de salmonelles.

Depuis les premières observations de Eberth jusqu'à nos jours, le genre *Salmonella* n'a cessé de présenter une importance considérable dans le domaine vétérinaire et sur la plan médical humain, en particulier à cause de la forte incidence chez l'homme des fièvres typhoïdes et des toxi-infections alimentaires à salmonelles (BORNERT 2000) comme nous le verrons par la suite.

1.2 Taxonomie

Domaine: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Classe: Gammaproteobacteria

Ordre : Enterobacteriale

Famille : *Enterobacteriaceae*

Genre : *Salmonella*

Les *Salmonella* sont dans l'appellation commune des entérobactéries, avec comme caractéristiques d'être lactose -, H₂S + et uréase -.

1.2.1 Entérobactérie

On définit classiquement les entérobactéries par 7 critères :

- ✓ Bacilles Gram- de dimension moyenne
- ✓ Non exigeants (culture facile)
- ✓ Oxydase - et en général Catalase +
- ✓ Nitrate réductase + (capables de réduire les nitrates en nitrites)
- ✓ Aéro-anaérobies facultatifs (capables de pousser en présence ou en absence de dioxygène)
- ✓ Fermentatifs du glucose (avec ou sans production de gaz)
- ✓ Mobiles par ciliature péritriche, rarement immobiles, non sporulés.

1.2.2 Caractères différentiels du genre *Salmonella*

Les différents biotypes ont par le passé été classés en espèces, puis en sous-genres (Kauffman) et enfin en sous-espèces sur la base de critères biochimiques et surtout sérologiques.

1.2.2.1 Caractères biochimiques

Les principaux caractères biochimiques permettant l'identification du genre *Salmonella* (HUMBERT *et al.*, 1998) sont :

- ✓ L'absence d'une uréase active, de tryptophane ou de phénylalanine désaminase
- ✓ L'absence de production d'indole et d'acétoïne (test de Voges-Proskauer négatif)
- ✓ La production d'hydrogène sulfureux à partir du thiosulfate (présence d'une thiosulfate réductase)
- ✓ La décarboxylation fréquente de la lysine et de l'ornithine
- ✓ La pousse fréquente sur le milieu au citrate de Simmons

1.2.2.2 Antigènes

Antigène somatique O (Ag O)

L'antigène O est un antigène de la paroi. Les antigènes O sont portés par les chaînes spécifiques du lipopolysaccharide (LPS). C'est un complexe contenant une protéine, un polysaccharide et un composé phospholipidique qui possède des propriétés immunologiques. On distingue 67 facteurs O selon la nature des sucres entrant dans la constitution des unités oligosaccharidiques du polysaccharide (HUMBERT *et al.*, 1998).

Les antigènes O sont formés d'une fraction lipidique appelée lipide A qui est responsable des effets toxiques, du core ou partie basale et du polysaccharide support de la spécificité (GLEDEL et CORBION, 1991)

Les antigènes sont classés en facteurs O majeurs et en facteurs O accessoires. Les facteurs majeurs sont liés à la présence de certains sucres (abéquose pour O : 4, tyvélose pour O : 9) (HUMBERT *et al.*, 1998).

L'antigène somatique est stable ; il résiste à l'alcool et au phénol pendant deux heures et demi à la température de 100 °C (DUMAS, 1958).

Antigène flagellaire (Ag H)

C'est un polymère de flagelline (protéine de structure des flagelles). Cet antigène est thermolabile, détruit par la chaleur à 100° C, par l'action de l'alcool et par les ferments protéolytiques. Il résiste au formol et perd son agglutinabilité par les anticorps en présence d'alcool et d'acide phénique. Son développement optimum s'obtient sur les milieux liquides mous après un séjour de 8 heures à 37 °C (DUMAS 1958). La grande majorité des sérovars possèdent deux systèmes génétiques et peuvent exprimer alternativement deux spécificités différentes pour leur antigène flagellaire. On dit que les antigènes flagellaires de *Salmonella* sont diphasiques (HUMBERT *et al.*, 1998).

Antigène de virulence (Ag Vi)

C'est un antigène de l'enveloppe, il a été identifié chez trois types de sérovars : Typhi, Paratyphi C et Dublin mais toutes les souches de ces sérovars ne possèdent pas forcément cet antigène (HUMBERT *et al.*, 1998).

Cet antigène est considéré comme un antigène de surface (DUMAS, 1958), il est distinct de l'antigène somatique et de l'antigène flagellaire. L'antigène Vi rend les germes inagglutinables par les anticorps O quand il est abondant. Il ne se développe pas si les cultures sont effectuées à une température inférieure à 25°C ou supérieure à 40°C. Un chauffage à 100°C le détruit et les germes deviennent agglutinables par les anticorps O. Il est de nature glucidolipidopolypeptidique.

A côté de ces antigènes il existe dans le genre *Salmonella*, des structures protéiques de surface: les pilis qui se différencient en pilis communs (intervenant dans l'hémagglutination mannose dépendante) et en pilis sexuels (intervenant dans la conjugaison bactérienne) et dont la présence est codée par des plasmides (GLEDEL et CORBION, 1991)

Sérotype	Antigène O	Antigène H	
		Phase I	Phase II
<i>S. paratyphi A</i>	Groupe A 1, 2, 12	a	
<i>S. paratyphi B</i> <i>S. typhimurium</i>	Groupe B 1, 4, [5], 12 1, 4, [5], 12	b i	1, 2 1, 2
<i>S. infantis</i> <i>S. virchow</i>	Groupe C1 6, 7 6, 7	r r	1, 5 e, n, x
<i>S. typhi</i> <i>S. enteritidis</i> <i>S. dublin</i>	Groupe D 9, 12, [Vi] 1, 9, 12 1, 9, 12, [Vi]	d g, m g, p	- - -

Tableau 1 : Extrait de la classification de Kauffman-White indiquant les formules antigéniques de quelques sérotypes.

La détermination des nombreux sérotypes est antigénique. Chaque sérotype possède une mosaïque d'antigènes : somatique O, capsulaire Vi, flagellaire H.

L'antigène O de nature glucidolipidique, correspond à l'endotoxine. Il est composé de plusieurs facteurs, désignés par des chiffres. Il provoque l'apparition d'anticorps spécifiques dans le sérum des malades.

L'antigène Vi est un antigène de surface que possèdent *S. typhi*, *S. paratyphi C* et *S. dublin*.

L'antigène H de nature protéique, est formé de plusieurs facteurs désignés soit par des lettres, soit par des chiffres. Le sérum des malades possède des agglutinines H spécifiques.

L'identification précise de chaque sérotype s'effectue par séro-agglutination en présence de divers anti-sérums mono-spécifiques O et H (tableaux 1 et 2).

1.2.3 Classification actuelle

La nomenclature des salmonelles est particulièrement complexe car elle a fait l'objet de controverses et de confusions liées principalement à un avis de la « Commission Judiciaire ».

La Commission Judiciaire est un sous-comité de l'ICSP (International Committee on Systematics of Prokaryotes) constitué de 12 membres élus pour neuf ans et renouvelables par tiers tous les trois ans et de cinq membres de droit (le président de l'ICSP, les trois secrétaires de l'ICSP et le président du comité éditorial de l'IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) qui est la publication de l'ICSP).

La Commission Judiciaire a pour mission de se prononcer sur tous les aspects de la nomenclature et ses principales attributions sont

- Examiner toutes les propositions de modification du Code de Nomenclature et de formuler des recommandations qui seront ensuite examinées par l'ICSP
- Etablir les listes des noms conservés et les listes des noms rejetés ainsi que d'autres listes utiles pour les taxonomistes
- Examiner les "recommandations minimales pour la description d'un nouveau taxon" établis par les divers sous-comités de taxonomie et de formuler des recommandations qui seront ensuite examinées par l'ICSP

- Examiner toutes les demandes concernant l'interprétation du Code de Nomenclature et les demandes de dérogation aux règles du Code de Nomenclature
- Considérer toutes les propositions de l'ICSP concernant la désignation des taxons d'un rang hiérarchique inférieur à la sous-espèce.

Le nouveau système se base sur l'interprétation taxonomique de Reeves (REEVES et Al., 1989) et de Le Minor et Popoff (LE MINOR et POPOFF, 1987). La commission judiciaire recommande l'utilisation de ce nouveau système.

Actuellement la classification (FRENEY et RENAUD, 2007) est basée sur les sérotypes (ou sérovars) et définit trois espèces :

- *Salmonella enterica* qui est divisée en sous-espèces correspondant en gros aux groupes de Kauffman
 - ✓ I : Sous espèce *enterica*
 - ✓ II : Sous espèce *salamae*
 - ✓ IIIa : Sous espèce *arizonae*
 - ✓ IIIb : Sous espèce *diarizonae*
 - ✓ IV : Sous espèce *houtenae*
 - ✓ VI : Sous espèce *indica*
- *Salmonella bongori* (ex V)
- *Salmonella subterranea*

La plupart des souches (99,8%) isolées chez l'homme et les animaux à sang chaud appartient à la sous espèce I : *Salmonella enterica* subsp *enterica*.

Elles portent en général le nom de leur sérovar, ainsi *Salmonella enterica* subsp *enterica* sérovar *Typhi* est communément appelé *S. typhi*, bien que cela soit incorrect du point de vue phylogénique, mais nettement plus pratique.

Il existe environ 2000 sérovars de *Salmonella*, classés en groupe et en sous groupe d'après leurs antigènes O communs et constants. L'antigène Vi sert à différencier des sérotypes dans les groupes C et D : il rend O-inagglutinable les sérovars *S. typhi* et *S. paratyphi C*.

Les antigènes H complètent les sérotypes des différents groupes.

Mélange O	Groupe (fréquence en France)	Nom usuel	Antigènes O	Antigènes H	
				Phase 1	Phase 2
OMA	B (54,3 %)	<i>Paratyphi B</i>	<u>1</u> , 4, [5], 12	b	1, 2
		<i>Wien</i>	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	b	l, w
		<i>Stanley</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	d	1, 2
		<i>Duisburg</i>	<u>1</u> ,4, 12, <u>27</u>	d	e, n, z15
		<i>Saintpaul</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12, <u>27</u>	e, h	1, 2
		<i>Reading</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	1, 5
		<i>Chester</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	e, h	e, n, x
		<i>Derby</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	f, g	[1, 2]
		<i>Agona</i>	<u>1</u> ,4, 12	f, g, s	-
		<i>Typhimurium</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	i	1, 2
		<i>Brandenburg</i>	<u>1</u> ,4, [5], 12	i, v	e, n, z15
		<i>Heidelberg</i>	1,4, 12	r	1, 2
		<i>Coeln</i>	4, [5], 12	y	1, 2
		<i>Essen</i>	4, 12	g, m	-
	<i>Abortusovis</i>		c	1, 6	
OMB	C (17,5 %) C1	<i>Paratyphi C</i>	6, 7 [Vi]	c	1, 5
		<i>Choleraesuis</i>	6, 7	c	1, 5
		<i>Isangi</i>	6, 7	d	1, 5
		<i>Livingstone</i>	6, 7	d	l, w
		<i>Eimsbuttel</i>	6, 7, <u>14</u>	d	l, w
		<i>Montevideo</i>	6, 7	g, m, s	-
		<i>Oranienburg</i>	6, 7	m, t	-
		<i>Thompson</i>	6, 7	k	1, 5
		<i>Infantis</i>	6, 7	r	1, 5
	C2	<i>Muenchen</i>	6, 8	d	1, 2
		<i>Manhattan</i>	6, 8	d	1, 5
		<i>Newport</i>	6, 8	e, h	1, 2
		<i>Blockley</i>	6, 8	k	1, 5
		<i>Lichtfild</i>	6, 8	l, v	1, 2
<i>Bovismorbificans</i>		6, 8	r	1, 5	
OMA	D (17,3%)	<i>Typhi</i>	9, 12 [Vi]	d	-
		<i>Enteretidis</i>	1, 9, 12	g, m	-
		<i>Dublin</i>	1, 9, 12	g, p	-
		<i>Gallinarum (volailles)</i>	<u>1</u> , 9, 12	-	-
		<i>Panama</i>	1, 9, 12	l, v	1, 5
		<i>Strasbourg</i>	[9], 46	d	1, 7
OMA	E (7%) E1	<i>Muenster</i>	3, 10	e, h	1, 5
		<i>Anatum</i>	3, 10	e, h	1, 6
		<i>Meleagridis</i>	3, 10	e, h	l, w
		<i>London</i>	3, 10	l, v	1, 6
		<i>Give</i>	3, 10, [<u>15</u>]	l, v	1, 7
	E4	<i>Senftenberg</i>	1, 3, 19	g, [s], t	-
OMB	G (2%)	<i>Kedougou</i>	<u>1</u> , 13, 23	i	l, w
		<i>Worthington</i>	<u>1</u> , 13, 23	z	1, 5
OMA	A (0,26 %)	<i>Paratyphi A (Afrique, Asie)</i>	<u>1</u> , 2, 12	a	-

Facteurs entre crochets : peuvent être absents sans que le sérotype soit changé.
Facteurs O soulignés : liés à la conversion phagique (lysogénique).

Tableau 2 : Extrait du tableau de Kauffmann-White : Formules antigéniques des sérotypes de *Salmonella* les plus fréquents en France

1.3 Pathogénicité

1.3.1 Fièvre typhoïde

Des expériences faites chez des humains volontaires ont montré que la dose infectante est assez élevée et qu'elle varie entre 10^5 et 10^9 bacilles.

Période d'incubation

Au cours de la période d'incubation, qui dure en moyenne de 10 à 14 jours, les germes pénètrent dans la muqueuse intestinale et atteignent les ganglions mésentériques où ils se multiplient : certains, véhiculés par la lymphe, se rendent jusque dans les différents organes du système réticulo-endothélial (foie, rate, moelle osseuse).

Période d'invasion (première semaine)

A partir des ganglions mésentériques infectés et des organes lymphoïdes, les germes envahissent le flot sanguin et provoquent une septicémie prolongée. Les débuts de la maladie sont insidieux et vagues ; ils se manifestent par des malaises variés : maux de tête continus, anorexie, troubles digestifs et constipation. Au cours de la première semaine, la fièvre est croissante, elle peut atteindre 40°C .

Période d'état (deuxième semaine)

Véhiculés par le flot sanguin, les germes se rendent vers d'autres tissus qu'ils infectent. Les organes le plus souvent atteints sont la vésicule biliaire et l'intestin grêle, particulièrement la deuxième moitié de l'intestin. Les germes y produisent des lésions et des ulcérations qui peuvent provoquer la perforation de l'intestin et la nécrose des plaques de Peyer. La fièvre se maintient à environ 40°C pendant 7 à 10 jours. Au début de la deuxième semaine, le malade présente une diarrhée et ses selles sont de couleur ocre ; il est gravement malade ; il souffre d'anorexie totale et souvent il délire.

Période de défervescence (troisième semaine)

Au début de la période de défervescence, qui survient d'ordinaire à la troisième semaine, le malade est épuisé et encore fébrile ; mais, à moins que des complications ne surviennent, son état commence à s'améliorer. La convalescence est souvent longue et la rechute, possible.

Complication

Environ 20% des individus atteints font une rechute. Lorsque des complications surviennent, presque tous les organes peuvent être atteints. On peut observer entre autres, la perforation intestinale, des hémorragies intestinales, la thrombophlébite, la cholécystite, la broncho-pneumonie, de l'empyème (accumulation purulente dans une cavité naturelle, en particulier pleurale, au cours d'une inflammation suppurée), des abcès pulmonaires et de l'endocardite. La mort survient chez 2% à 10% des individus traités, les complications sont cependant très rares.

1.3.2 La fièvre paratyphoïde

On utilise l'expression << fièvre paratyphoïde >> pour désigner l'infection causée par *S. paratyphi*. Cette infection présente les allures cliniques et les lésions de la fièvre typhoïde. En Amérique du nord, c'est *S. paratyphi A* que l'on isole le plus souvent. Quant à *S. enterica*, il est responsable d'une infection semblable à la fièvre paratyphoïde. Ces salmonelles peuvent causer une gastro-entérite très grave, accompagnée ou non de bactériémie.

1.3.3 La fièvre entérique ou salmonellose

Les expressions <<fièvre entérique>> et << salmonellose>> sont habituellement utilisées pour désigner les infections causées par les *Salmonella* autres que *S. typhi* et *S. paratyphi*, c'est-à-dire les autres sérotypes de salmonelle (plus de 2000). Ces derniers sont responsables d'une entérite le plus souvent bénigne qui, en général, ne représente ni bactériémie ni complications et qui guérit facilement d'elle-même.

L'image clinique de la salmonellose varie suivant plusieurs facteurs, dont la virulence du germe, la résistance du sujet infecté et l'importance de la dose infectante.

1.3.4 Intoxications alimentaires

Les espèces susceptibles d'être impliquées dans les intoxications alimentaires sont celles- là même qui sont responsables de la fièvre entérique. Parmi les sérotypes le plus souvent impliqués, on compte *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. adelaide*. Pour qu'il y ait intoxication, il faut que les germes aient eu le temps de se multiplier dans la nourriture. Bien que l'on qualifie de telles affections d'empoisonnements alimentaires, il est probable que la multiplication des germes et l'invasion de la muqueuse intestinale font partie de la pathogénèse. La période d'incubation varie de 8 heures à 3 jours. Les principaux symptômes, dont la gravité est très variable, se manifestent par des vomissements, des douleurs abdominales et de la diarrhée. Les aliments le plus souvent en cause sont les viandes, les produits laitiers et les œufs, contaminés par les animaux domestiques porteurs des germes. Le diagnostic se fait par l'analyse bactériologique des aliments suspects ou des selles de l'individu atteint.

1.3.5 Epidémiologie

Vu le large spectre d'animaux pouvant être porteurs de *Salmonella*, une grande variété de produits alimentaires peut être à l'origine d'une contamination humaine : viande et particulièrement volaille, produits carnés, oeufs et produits laitiers.

Les salmonelloses d'origine alimentaire peuvent donner lieu à des foyers très importants, qui peuvent atteindre une échelle nationale (et même internationale) si un aliment commercialisé à large diffusion se trouve contaminé.

En 1994 aux Etats-Unis, par exemple, une épidémie provoquée par une crème glacée a touché 224 000 personnes.

En France, une des plus importantes épidémies, dont la source n'a pu être identifiée, survenue fin 1985, aurait touché 25 000 personnes d'après l'estimation la plus faible. En France toujours, en 2001, 64% des toxi-infections alimentaires déclarées, avec

agent pathogène identifié, ont été provoquées par des *Salmonella* et ont touché plus de 1700 personnes (HAEGHEBAERT et al., 2001). En 2005, 39,9% des 311 foyers français de cas groupés signalés au Centre National de Référence étaient causés par *Salmonella* sérotype *Typhimurium* suivi par le sérotype *Enteritidis* (33% des foyers). Toujours en 2005, 146 nourrissons ont été touchés, du lait infantile était à l'origine de l'épidémie (BROUARD et al., 2006). Il est difficile d'avoir une idée du nombre réel de cas annuels de salmonelloses, mais on estime que les cas déclarés peuvent être multipliés par 20 à 100. Les toxi-infections alimentaires collectives doivent obligatoirement être déclarées aux DDASS (Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales) ou aux DSV (Direction des services vétérinaires) par les médecins, les biologistes, les responsables d'établissements ou les particuliers.

1.3.6 Epidémiologie de la fièvre typhoïde

Les *Salmonella* responsables des fièvres typhoïdes ayant l'homme pour seul réservoir, la contamination se fait par ingestion d'eau ou d'aliments ayant subi une contamination fécale d'origine humaine. Comme toutes les maladies à transmission oro-fécale, ces fièvres surviennent le plus souvent dans des zones où l'hygiène est précaire, et frappent principalement les pays en développement en Asie, en Afrique ou en Amérique Latine.

Les données mondiales les plus récentes font état de 21 millions de cas annuels de fièvre typhoïde, et de 200 000 morts. La maladie n'a pas totalement disparu des pays industrialisés. En France métropolitaine, 75 cas ont été déclarés en 1996, 71% d'entre eux étant causés par une contamination survenue à l'étranger. En 1997, une épidémie qui a nécessité l'hospitalisation de 26 personnes est survenue à Utelle, dans les Alpes-Maritimes, probablement due à la consommation de charcuterie lors d'un banquet préparé par un porteur du bacille. Une autre épidémie est intervenue en 1998 à Villeneuve St Georges où, après consommation d'un repas commun, 20 personnes ont présenté une fièvre typhoïde et 95 une gastro-entérite précoce. En 2003, un foyer de sept cas groupés liés à un lieu de restauration, a été détecté à Paris 16e. La source de la contamination a été identifiée, il s'agissait d'un porteur sain travaillant en cuisine. Les cas annuels en France sont inférieurs à 0,3 pour 100 000 habitants. Depuis 1999, 150 à 200 souches de *S. Typhi*, isolées en France, sont

étudiées chaque année au Centre National de Référence des Salmonella (Institut Pasteur, Paris). Ces souches proviennent quasi-exclusivement de cas importés.

1.3.7 Personnes à risque

Bien que les adultes et enfants sains courent le risque de contracter la salmonellose causée par les oeufs, les personnes âgées, les nourrissons et les personnes dont l'immunité est réduite courent de plus grands risques de contracter des cas graves de la maladie. Chez ces sujets, un nombre relativement réduit de *Salmonella* peut causer un cas grave. La majorité des décès résultant de *S. enteritidis* s'est produite dans les maisons de repos pour personnes âgées. La nourriture contenant des oeufs préparée pour ces personnes plus susceptibles dans les hôpitaux, maisons de repos, restaurants ou chez soi doit être bien cuite et servie rapidement.

1.3.8 Prévention

La prévention commence par une hygiène sans faille: respect des règles de production, de transport et de stockage des aliments. Il faut de plus se souvenir que le froid ne tue pas la bactérie.

- bien cuire les aliments d'origine animale, surtout la volaille à une température supérieure à 65°C.
- respecter les dates limites de consommation (DLC) et les températures de conservation.
- conserver les œufs ainsi que les préparations à base d'œufs au réfrigérateur,
- respecter la chaîne du froid durant et après les achats; ne jamais recongeler un produit décongelé.
- se laver les mains avant et après la manipulation des aliments, et nettoyer le matériel de cuisine en contact avec les aliments. Ne pas couper les légumes sur une planche à découper ou l'on a tranché de la volaille par exemple.
- laver soigneusement les légumes crus et herbes aromatiques.

1.4 Mise en évidence dans les denrées alimentaires

La recherche des *Salmonella* se pratique lorsqu'il y a survenue d'une TIAC, mais aussi en routine, sur les chaînes de production agro-alimentaire concernées ou par l'intermédiaire d'un laboratoire indépendant, ce qui est précisément le contexte de l'étude que nous menons. Le critère microbiologique relatif aux *Salmonella* est : « absence dans 25 grammes d'aliment »

L'objectif de l'analyse microbiologique est donc de rechercher la présence d'au moins une *Salmonella* dans un échantillon de produit. La faible quantité et le faible pourcentage de *Salmonella* par rapport aux autres bactéries dans les produits alimentaires nécessite plusieurs étapes de culture : pré enrichissement, enrichissement, isolement sélectif et identification. Ces étapes sont décrites dans la méthode de référence pour la recherche de *Salmonella* (NF ISO 6579). L'analyse selon cette méthode impose un délai de réponse important.

1.4.1 Méthode d'enrichissement pour la recherche de *Salmonella*

Le pré enrichissement est destiné à revivifier les cellules de façon à faciliter la culture dans les bouillons d'enrichissement : il est réalisé à l'aide de divers milieux, nous retiendrons juste celui de la méthode de référence : le milieu eau peptonée tamponnée. 25g d'aliment sont broyés dans 225ml de milieu pendant deux minutes. Les milieux peuvent être préparés à double concentration pour faciliter l'inoculation (cas des échantillons liquides). Un dénombrement présomptif peut ainsi être réalisé par la technique de numération en milieu liquide adaptée aux grands volumes : 50ml de la suspension à analyser sont mélangés dans un ballon à 50ml de milieu à double concentration. Des quantités connues inférieures à 50ml peuvent également être mélangées dans 50ml de milieu à double concentration et le mélange porté à 100ml. Dans tous les cas, l'incubation est réalisée pendant 16 à 24 heures à 37 °C.

L'enrichissement en vue de l'isolement et de l'identification s'effectue sur des milieux sélectifs, soit directement à partir du produit ou de ses dilutions, soit le plus souvent à partir du milieu de pré enrichissement. On utilise deux types de milieux suivant la

norme NF EN ISO 6579 : Le milieu de Rappaport- Vassiliadis et celui sélénite-cystine de *Salmonella*, dont les compositions figurent dans l'annexe 1.

Pour le milieu de Rappaport- Vassiliadis, le milieu de culture est ensemencé avec l'échantillon ou avec une culture enrichie dans l'eau peptonée et incubé 24 heures à 43°C.

La lecture se fera sur milieux sélectifs par isolement des cultures qui se sont développées.

Dans le cas du bouillon sélénite cystine, ajouter l'échantillon au bouillon. Mélanger l'échantillon liquide dans un bouillon doublement concentré selon le rapport 1/1.

Le milieu sélénite cystine est mis à incuber à 37°C pendant 24 heures (Bänfer 1971) pour d'autres auteurs, la température de 43°C serait meilleure.

Après 6 à 12 heures et si nécessaire 18 à 24 heures, repiquer la culture sur un milieu sélectif, qui peut être la gélose d'Edel-Kampelmacher ou de Rambach, dont les compositions figurent Annexe 1.

Isolement sélectif

La norme ISO 6579 préconise l'utilisation de la gélose d'Edel-Kampelmacher pour l'isolement, ou celui de Rambach (utilisé au LVAD).

- Ensemencement direct avec le bouillon d'enrichissement, puis incubation 18-24 heures à 37°C.

- Lecture

Colonies	Micro-organismes
Colonies opaques, blanches ou rouge – rosé entourées d'une zone brillante rouge	Lactose- et saccharose -; <i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i> (pas de prolifération), <i>Pseudomonas</i> (petites colonies entaillées), etc.
Colonies jaunes à jaune - vert entourées d'une zone jaune - vert intense	Lactose- ou saccharose positifs : <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , etc.

1.4.2 Détermination du sérotype

Ce que l'on recherche :

- Antigène O de paroi
- Antigène H du flagelle pour les souches mobiles
- Antigène Vi de la micro-capsule

Le sérotypage par agglutination sur lame se fait selon le schéma de Kauffman-White à l'aide de sérums O polyvalents :

- OMA (agglutinines des groupes A, B, D, E, L)
- OMB (agglutinines des groupes C, F, G, H)
- OMC (agglutinines des groupes I, J, K, M, N, O, P)
- OMD (agglutinines des groupes X, Y, Z)
- OMF (agglutinines des groupes 54 à 59)
- OMG (agglutinines des groupes 60 à 67)
- Antigènes O monovalents
- Sérums H polyvalents puis monovalents
- Sérum Vi

La souche à identifier est prélevée à partir d'une culture obtenue après 24 heures sur gélose nutritive ordinaire : elle doit être S (smooth) car en R (rough) elle est impropre au sérotypage. Pour vérifier, on réalise un essai d'auto-agglutination en émulsionnant un peu de culture dans une goutte d'eau physiologique sur une lame : l'agglutination signale une phase R.

Le sérotypage est ensuite réalisé en utilisant les sérums polyvalents O (OMA et OMB essentiellement qui correspondent à 98% des salmonelles humaines ou d'animaux à sang chaud) puis avec les monovalents correspondants.

La mise en évidence est facilitée par l'utilisation d'un miroir concave ou d'un fond noir. En cas d'essai négatif, qui peut être dû à des causes variées comme un biotype appartenant à un groupe non testé ou la présence d'antigène Vi gênante, il faut effectuer des essais avec un sérum anti-Vi et, en cas de réponse positive, il faut renouveler les agglutinations O sur suspension chauffée. On réalise ensuite la recherche des antigènes H en phase 1 ou 2 avec un mélange d'antigènes monovalents.

La gélose de Sven Gard (Pasteur, Annexe 1) permet l'étude de l'inversion de phase de l'antigène H.

Le but de déterminer ces antigènes aussi précisément est d'obtenir la formule antigénique qui désigne le sérovars, seul moyen d'individualiser une variété donnée de Salmonelles.

Ceci dans un intérêt épidémiologique pour la filiation des cas de Fièvre typhoïde, paratyphoïde et gastro-entérite alimentaire

II

LISTERIA MONOCYTOGENES

2 Listeria monocytogenes

Depuis une vingtaine d'années, l'approche des connaissances quant à la transmission de la listériose a fortement évolué. L'observation des flambées épidémiques a mis en évidence le rôle de l'aliment dans la contamination humaine.

Il est important de rappeler à ce stade que la listériose est une zoonose essentiellement animale et parfois accidentellement humaine.

2.1 Historique

Listeria monocytogenes doit son nom à la mémoire du docteur John Lister.

Les premières descriptions de la bactérie datent de 1911. Hulphers, vétérinaire Suédois, fut le premier à avoir décrit cette infection chez un lapin.

Dumon et Cotoni, isolèrent la même souche à partir d'un liquide céphalorachidien chez l'homme et cette souche demeure toujours conservée au niveau de l'institut Pasteur de Paris depuis 1921 (BELLOUNI, 1990) (BERCHE, 1999).

La bactérie a été décrite la première fois en 1926 par Murray-Webb et Swann, lors d'une épizootie chez des lapins et des cobayes qui présentaient une mononucléose sanguine et des lésions de nécrose au niveau du foie. Ils lui donnèrent alors le nom de *Bacterium monocytogenes*.

Nyfeld décrit une manifestation chez l'homme en 1929, il lui donne le nom de *Bacterium monocytogenes hominis*.

Burn démontre le rôle de la bactérie dans l'infection périnatale en 1933.

Reiss, Potel et Krebs décrivent en 1951 la forme septicémique du nouveau-né.

Ce n'est qu'en 1960 que les infections humaines à *Listeria* ont été diagnostiquées, et en 1981 qu'on a observé les premières flambées de listériose et démontré que la bactérie responsable de la maladie pouvait être transmise par certains aliments, en plus des modes habituels de transmission. Le CDC (Centers for Disease Control and Prevention) qui est l'organisation gouvernementale américaine chargée de promouvoir

la santé et la qualité de vie par la prévention et le contrôle des maladies, estime à 1850 cas d'infection causés annuellement aux USA, dont 425 cas mortels (soit 23 %).

- 41 cas au Canada en 1981 dont 17 morts (dont 83 % étaient des cas périnataux) (salade de choux conservée à +4°C et vendue dans un supermarché; les choux provenaient d'un champ fertilisé avec des crottins de moutons contaminés).
- En 1983 à Boston, 49 personnes dont 14 morts (dont 14 % périnataux) ont été atteintes de listériose : un lait pasteurisé semble à l'origine de l'épidémie (mais aucune confirmation).
- En 1984/85, ce sont des fromages frais de type Mexicain, fabriqués aux USA à partir de lait américain (Californie du Sud) on recense 142 cas dont 48 morts (85 % des morts furent périnataux). Le lait qui a servi à la fabrication des fromages à caractère présure de type mexicain provenait d'un troupeau infecté. La souche responsable est un type phagique de type 4b particulier de *L. monocytogenes*.
- 32 cas en 1987 à Philadelphie dont 11 morts ; la cause ne fut jamais identifiée.
- 56 cas en 1988, une quarantaine de cas au Massachusetts en 1983 (problème de lait pasteurisé - sérotype 4b).
- 122 cas en Suisse entre 1983 et 1987, faisant 34 morts ; l'aliment responsable est un fromage à pâte molle (Vacherin Mont-d'or) contaminé par *L. monocytogenes* sérotype 4b et appartenant à deux lysotypes particuliers.
- En 1984/85, des fromages frais de type mexicain, fabriqués en Californie à partir de lait américain, sont à l'origine de 142 cas dont 48 morts (85% furent des morts prénatales).
- De la langue de porc en gelée a provoqué 279 cas de listériose et tué 63 personnes en France en 1992.
- En 1993, 39 cas ont été recensés en France suite à la contamination par des rillettes;
- En 1995, le Brie de Meaux causa 20 cas dont 4 morts. (ROCOURT, 1997)
- En 1997, fromages à pâte molle ; 14 cas dont 2 morts en France (dont un avortement et un enfant mort à la naissance). (JACQUET, 1998)
- Aux Etats Unis, d'août à décembre 1998, 100 cas d'infection (dont 20 mortels comprenant 2 avortements) dus à *L. monocytogenes* sérotype 4b ont été recensés dans 11 Etats (notamment en Ohio, à New York, au Tennessee, au Massachusetts, en Virginie-Occidentale, au Michigan, au Connecticut, en Oregon, Vermont et en Georgie). Des saucisses de type hot-dog étaient la source de l'infection. Le 22 décembre, le

fabricant, Bil Mar Foods, a volontairement rappelé des lots de production particuliers de saucisses (15 millions de livres) et d'autres produits de viande pouvant être contaminés.

- Mai 1998, la listériose devient une maladie à déclaration obligatoire à la DDASS (ANNEXE 2).

- Une épidémie de listériose a eu lieu dans la région de Swindon au Royaume-Uni au cours de l'automne 2003. Cinq cas ont été détectés chez des femmes enceintes. Il est probable que quatre d'entre elles avaient mangé des sandwiches préemballés provenant d'un point de vente du même hôpital.

- Dix cas de listériose ont été déclarés dans une région (150 000 habitants) du nord-ouest de la Suisse pendant une période de huit semaines au printemps de l'année 2005. Il s'agissait de huit patients immunodéprimés atteints de bactériémie (trois décès), et de deux femmes enceintes ayant subi un avortement septique. Les entretiens avec les patients ont permis de découvrir rapidement qu'un fromage à pâte molle (tomme) fabriqué et distribué localement était la source alimentaire incriminée dans l'épidémie.

Malgré cela, il est intéressant de remarquer que les recherches épidémiologiques dans différents pays rapportent que la listériose est une maladie relativement rare. Ainsi, il a été établi par le CDC aux Etats Unis que le seuil annuel de cas de listériose est de 7.1 pour 10^6 habitants (GELLIN et BROOME, 1989) (GELLIN et al., 1991)

2.2 Taxonomie

Listeria appartient à la branche phylogénétique dite des *Clostridium*, qui contient *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Brochothrix* et *Bacillus*. (AVRIL, 2000) (ROCOURT, 2000), bien que sa morphologie ait fait qu'elle fut longtemps considérée comme une bactérie corynéforme.

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

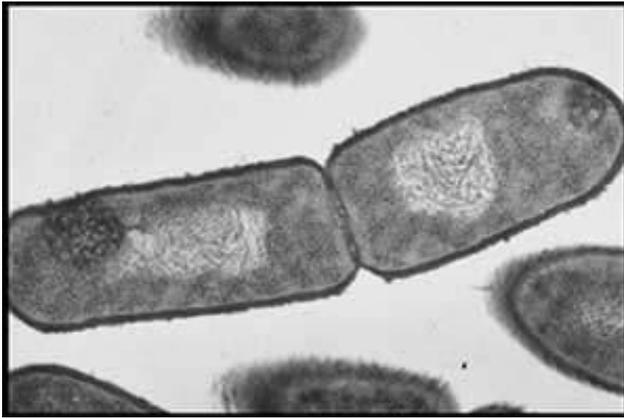
Listeria se définit par les critères suivants sur le plan taxonomique (ROCOURT, 1996)

- un G+C % ADN compris entre 36 et 46%
- la présence d'acides lipoteichoïques
- l'absence d'acides mycoliques et MK7 (AVRIL, 2000)
- le peptidoglycane possède du mDAP

2.2.1 Caractéristiques phénotypiques

Les *Listeria* sont donc des bactéries Gram positif, en bâtonnets réguliers non sporulant, de 0.4 à 0.5 μm de diamètre et 0.5 à 2 μm de longueur, avec des extrémités arrondies (FIGURE 6).

Les cellules sont isolées ou regroupées en courtes chaînettes (FIGURES 1 et 2)



A gauche : Figure 1 : Regroupement de *Listeria* en courte chaînette vu au microscope électronique.

A droite : Figure 2 : Aspect de *L. monocytogenes* sous coloration de Gram

L. monocytogenes doit être considérée comme non capsulée. Dans les cultures âgées, des filaments peuvent être observés (6-20 µm), et les cellules Gram+ peuvent devenir Gram-. La bactérie est aérobie microaerophile et anaérobie facultative. (SEELIGER et JONE, 1986)

Listeria est positive à la réaction au rouge de méthyle et au test de Voges Proskauer. Ces bactéries sont indole-, esculine+, hippurate+, urée-, gélatine-, caséine-.

Les tests de mobilité doivent être réalisés à 20-25°C car à 37°C, le développement des flagelles est si faible que la bactérie peut paraître immobile.

Les cellules résistent à 55°C, 30mn ; et à 40% de bile et à 10% de NaCl.

Tous les caractères biochimiques communs à *Listeria* sont regroupés dans le tableau 3.

CARACTÈRES BIOCHIMIQUES COMMUNS AU GENRE *LISTERIA*

Réactions positives	Réactions négatives
Mobilité 22 °C Catalase Glucose, fructose, mannose, amygdaline salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol VP, RM Esculine Type respiratoire : aéro-anaérobie réduction du lait tournesolé	Oxydase Gaz en glucose Uréase Indole Gélatinase H ₂ S

Tableau 3 : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria* (LARPENT, 2000)

2.2.2 Identification des espèces de *Listeria*

Le genre *Listeria* est constitué de deux branches distinctes, l'une comprenant *L. monocytogenes* et les espèces génomiquement proches : *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri*, la seconde comprenant uniquement *L. grayi*.

Parmi ces six espèces, deux sont naturellement pathogènes : *L. monocytogenes* pour l'homme et l'animal, et *L. ivanovii* uniquement pour l'animal et presque toujours sous forme d'avortement.

Listeria grayi a été découverte en 1966 par Larsen et Seeliger à partir d'une coproculture chez un chinchilla ; cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol.

Listeria murrayi a été découverte en 1987 par Welshimer et Meredith à partir d'une végétation ; une fois encore cette souche se caractérise par la fermentation du mannitol et la réduction des nitrates.

Listeria ivanovii a été découverte en 1984 par le microbiologiste bulgare Ivanov lors d'un avortement chez des brebis ; cette souche s'est caractérisée par une forte hémolyse (BERCHE, 1999)

Listeria innocua a été découverte en 1981 par Seeliger à partir de l'environnement et de l'intestin de l'homme et des animaux ; cette souche est par contre non hémolytique donc non pathogène.

Listeria seeligeri et *Listeria welshimeri* ont été mises en évidence en 1982 lors d'hybridations ADN / ADN.

Les différentes espèces peuvent être différenciées sur la figure 3 grâce aux tests microbiologiques.

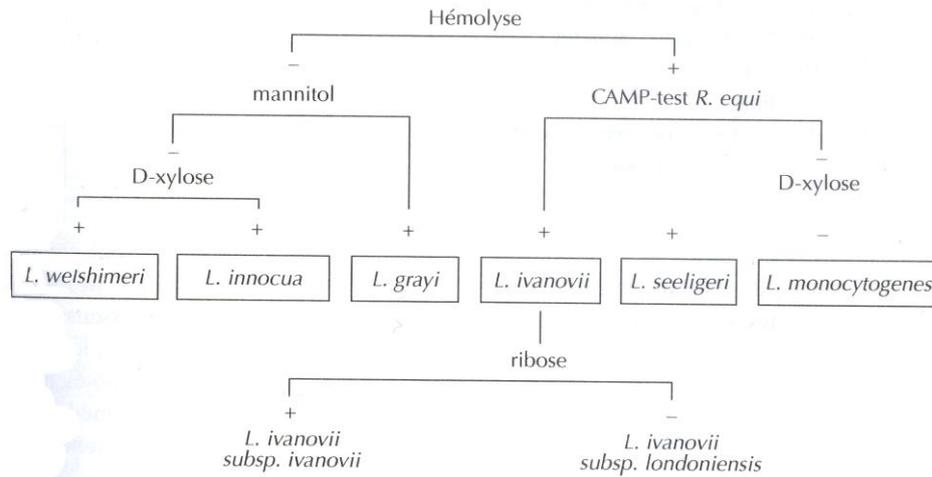


Figure 3 : Identification des espèces de *Listeria* (LARPENT, 2000)

La caractérisation phénotypique de *Listeria monocytogenes* fait appel aux méthodes classiques d'identification bactérienne : bacilles à Gram+, catalase+, oxydase-, mobilité à 20°C, β-hémolyse sur gélose au sang, D-xylose-, D-mannitol-, L-rhamnose+, α-méthyl-D-mannoside+. Cette bactérie ne possède pas de nitrate réductase, fermente le glucose sans gaz, hydrolyse l'esculine, ne produit pas d'indole, ni d'H₂S. Elle est uréase- et non protéolytique (gélatine-), phosphatase alcaline+. L'arabinose, le lactose et la dextrine sont tardivement fermentés ou négatifs. Xylose, raffinose, inositol et mannitol ne sont pas fermentés (TABLEAU 4).

CARACTÉRISTIQUES	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. murrayi</i>	<i>Jonisia denitrificans</i>
α-Méthyl-D-mannoside	+	+	±	-	-	+	+	•
β-hémolyse	+	-	+	-	+	-	-	-
Réduction du nitrate	-	-	-	-	-	-	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+	-
RM / VP	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / +	+ / -
Rhamnose	+	±	-	±	-	-	±	-
Xylose	-	-	+	+	+	-	-	+
Pathogénicité pour la souris	+	-	-	-	+	-	-	+ *

Tableau 4 : Différenciation des espèces de *Listeria* et des organismes apparentés (BIND, 1990)

Depuis la première description de *Listeria* en 1926, la littérature a mentionné huit espèces : *L. monocytogenes* en 1926, *L. denitrificans* et 1948, *L. grayi* en 1966, *L. murrayi* en 1971, *L. innocua* et 1981, *L. welshimeri* et *L. seeligeri* en 1983, *L. ivanovii* subsp. *Ivanovii* en 1985, *L. ivanovii* subsp *londoniensis* en 1992.

La distance génomique observée entre *L. monocytogenes* d'un côté, *L. grayi* et *L. murrayi* de l'autre avait conduit Stuart et Welshimer à proposer le déplacement de ces derniers dans un nouveau genre, « *Murraya* » en 1974. Pourtant le haut pourcentage de similarité entre *L. monocytogenes* et *L. murrayi* a confirmé l'appartenance de cette dernière au genre *Listeria*.

La découverte de profils d'isoenzymes identiques entre *L. grayi* et *L. murrayi*, a permis de classer les deux en une seule espèce : *L. grayi* (confirmé ensuite par hybridations ADN/ADN).

Ensuite les hybridations ADN/ADN et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S, corrélées à l'analyse des profils d'isoenzymes, ont permis de classer les espèces comme sur la figure 4.

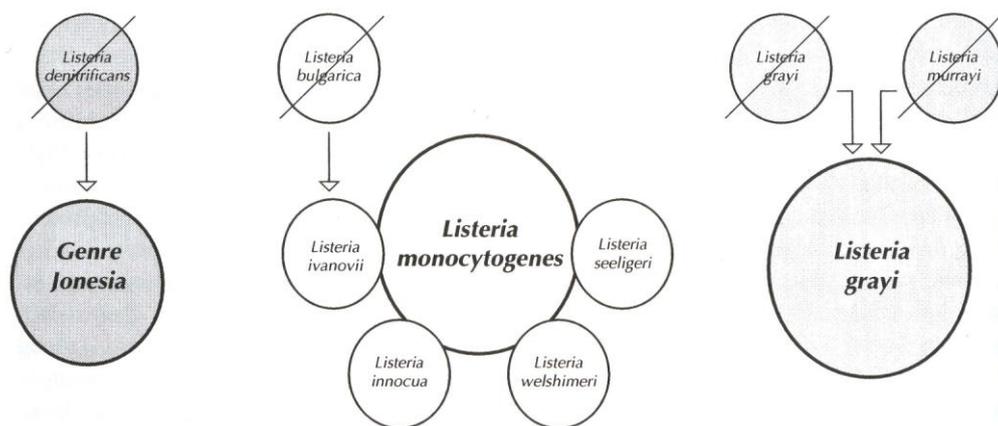


Figure 4 : Evolution de la taxonomie des *Listeria* (d'après BIND, 1990)

2.2.3 Sérotype

On distingue 15 antigènes somatiques (I à XV) et 5 antigènes flagellaires (A à E). La combinaison de ces différents facteurs dans une même bactérie permet de reconnaître actuellement 17 sérovars (TABLEAU 5).

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

A l'intérieur de l'espèce *L. monocytogenes*, s'individualisent 5 groupes génomiques:

- I : avec les sérotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4^e et 7, c'est *L. monocytogenes* sensu stricto.
- II : souches fortement hémolytiques du sérovar 5. *L. ivanovii* avec les deux sous-espèces *ivanovii* et *londoniensis*.
- III : sérovars 4ab, 6a, 6b, non hémolytiques et non pathogènes pour la souris : *L. innocua*.
- IV : souches non hémolytiques du sérovar 6a et 6b produisant de l'acide à partir du xylose : *L. welshimeri*.
- V : souches hémolytiques non pathogènes des sérovars 1/2c, 4c, 4d, 6b : *L. seeligeri*.

En pathologie humaine, les sérovars 4b, 1/2b et 1/2a de *L. monocytogenes* sont surtout responsables de listériose (SCHUCHAT et al. ,1991)

ESPÈCES	SÉROVARS	ANTIGÈNES SOMATIQUES (O)	ANTIGÈNES FLAGEL.
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	3a	II (III) IV	A B
	3b	II (III) IV (XII XIII)	A B C
	3c	II (III) IV (XII XIII)	B D
	4a	(III) (V) VIII IX	A B C
	4ab	(III) V VI VIII IX X	A B C
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	4e	(III) V VI (VIII) IX	A B C
7	(III) XII XIII	A B C	
<i>Listeria ivanovii</i>	5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
<i>Listeria innocua</i>	6a	(III) V (VI)(VII) (IX) XV	A B C
	6b	(III) (V) (VI)(VII) IX X XI	A B C
	4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
<i>Listeria welshimeri</i>	1/2b	I II (III)	A B C
	4c	(III) V VII	
	6a	(III) V (VI)(VII) (IX) XV	
	6b	(III) (VII) IX X XI	
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2a	I II (III)	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
	1/2c	I II (III)	B D
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	6b	(III) (V) (VI)(VII) IX X XI	A B C
<i>L. grayi</i>		(III) XII XIV	E

Tableau 5 : Sérovars de *Listeria* (LARPENT, 2000)

2.3 Pathogénicité

La listériose d'origine alimentaire est une maladie assez rare mais grave qui affiche des taux de létalité élevés (20-30 %) par rapport à d'autres pathogènes d'origine alimentaire, par exemple *Salmonella*. La maladie touche principalement des groupes de population dits particulièrement sensibles. *L. monocytogenes* est un pathogène opportuniste qui touche souvent ceux qui ont une maladie grave ou un état grave (par exemple, des patients immunodéprimés, des malades du SIDA, des patients atteints de maladies chroniques comme la cirrhose qui affecte le système immunitaire); les femmes enceintes; les fœtus et les nouveau-nés et les personnes âgées. *L. monocytogenes* est très répandu dans l'environnement et dans les aliments. Néanmoins, ce n'est que lorsque plusieurs poussées épidémiques importantes ayant une même source se sont produites en Amérique du Nord et en Europe durant les années 1980 que l'on a reconnu le rôle des aliments comme voie de transmission principale pour l'exposition à *L. monocytogenes* (BROOME et al., 1990). En pathologie humaine, cette notion de maladie d'origine alimentaire est apparue pour la première fois en 1981 lors de l'épidémie des Provinces Maritimes au Canada, où 34 cas de listérioses foeto-maternelles et 7 cas de listérioses chez l'adulte ont été recensés (SCHLECH et al., 1988)

Un facteur important dans la listériose d'origine alimentaire est que le pathogène peut se développer en grand nombre à des températures de réfrigération si celle-ci dure assez longtemps. Malgré le fait qu'une grande variété d'aliments puisse être contaminée par *L. monocytogenes*, les poussées épidémiques et les cas sporadiques de listériose sont associés principalement aux aliments prêts à consommer, c'est-à-dire une catégorie hétérogène de denrées alimentaires qui peuvent être subdivisées de nombreuses façons et varient d'un pays à l'autre selon les habitudes alimentaires locales; la disponibilité et l'intégrité de la chaîne du froid; et des règlements spécifiant, par exemple, la température maximale au point de vente au détail. Bien que la listériose soit une maladie assez rare, sa gravité et la mise en cause très fréquente d'aliments industriels, notamment durant les poussées épidémiques, signifie que l'impact social et économique de la listériose est l'un des plus lourds parmi les maladies d'origine alimentaire (ROBERTS, 1989)(ROBERTS et PINNER, 1990). La listériose touche principalement les pays industrialisés et on ignore si les différences dans les taux d'incidence entre pays développés et pays en développement reflètent

de vraies différences géographiques, des différences dans les habitudes alimentaires et le stockage des aliments ou des différences dans les méthodes de diagnostic et de déclaration de cas.

2.3.1 Listériose

Diverses manifestations cliniques sont associées à la listériose et celles-ci peuvent être groupées en deux catégories: listériose invasive et listériose non invasive. On parle de listériose invasive lorsqu'une infection initiale du tissu intestinal par *L. monocytogenes* se propage à d'autres parties du corps par ailleurs stériles, tels que l'utérus chez les femmes enceintes, le système nerveux central ou le sang, ou plusieurs organes.

2.3.1.1 Listériose invasive

La listériose invasive est une septicémie d'origine digestive avec risque d'infection foeto-placentaire et de méningo-encéphalite. La maladie survient surtout des patients fragiles (femmes enceintes, patients immunodéprimés sous chimiothérapie, patients sidéens ou présentant des anomalies hépatiques tels que cirrhose ou hémochromatose ou encore chez certains sujets génétiquement prédisposés). Après une incubation de 3 jours à 8 semaines, la maladie débute par une fièvre isolée (forme bactériémie), associée à des céphalées (forme méningo-encéphalitique) ou à des signes d'atteinte des nerfs crâniens (rhombencéphalite) sans diarrhée.

L'infection du système nerveux central

La listériose neuro-méningée est une méningo-encéphalite lympho-monocytaire ou purulente, avec fièvre, céphalées, raideur de la nuque, parfois des paralysies des nerfs crâniens (rhombencéphalites). Chez le nouveau-né, l'atteinte méningée prédomine.

L'infection materno-infantile

Les signes d'infection chez la mère sont souvent inapparents ou se résument à un syndrome pseudo-grippal avec fièvre et frissons, fatigue, maux de tête et myalgies qui

précèdent l'accouchement de 2 à 14 jours ou plus. Une rechute fébrile, avec bactériémie, est souvent observée au cours de l'accouchement. La plupart des listérioses sont décrites après le 5ème mois de grossesse, mais des avortements spontanés ou répétés peuvent survenir avant cette date. L'infection après le 5ème mois peut souvent entraîner un accouchement prématuré.

Le nouveau-né est infecté in utero par voie sanguine à la suite d'une bactériémie de la mère. L'infection est évidente dès la naissance avec cyanose, apnée, détresse respiratoire et troubles de la conscience (apathie, convulsions), rarement une éruption. Une pneumonie péri-bronchiale est souvent retrouvée. La mortalité est élevée (parfois inférieure à 50%). Dans moins de 10% des cas, le nouveau-né est contaminé dans la période périnatale ou au cours de l'accouchement, sans infection placentaire. L'enfant naît apparemment sain et l'infection apparaît 8 à 60 jours après l'accouchement, avec méningite purulente, fièvre, insomnie, irritabilité, troubles de la conscience. Le diagnostic est précocement établi, expliquant la faible mortalité dans cette forme clinique.

2.3.1.2 Listériose non invasive

Chez des sujets immunocompétents, des gastro-entérites ont été décrites avec diarrhée survenant quelques heures après absorption d'aliments massivement contaminés (salade de soja...) et habituellement sans complications neurologiques ni septicémie.

2.3.1.3 Portage

L'homme tout comme l'animal reste fréquemment porteur sain pendant de longs mois, même après traitement. Il s'agit d'un portage transitoire et sans signification clinique.

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

Chez l'homme, des travaux similaires, notamment ceux de Seeliger (1961) et ceux de Gray et Killinger (1966) ont montré la présence de *Listeria monocytogenes* dans les matières fécales, la gorge et le pharynx d'individus sains. Ce portage varie de 0.6% à 90% des sujets examinés. Ces variations sont fonction des individus, de leur

profession (éleveurs, vétérinaires, techniciens de laboratoire) mais aussi des pays où sont effectuées les enquêtes (EUZÉBY, 2006).

2.3.2 Physiopathologie de la listériose

L. monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative. La voie d'entrée est digestive, due à des aliments contaminés en général. Les bactéries traversent la paroi intestinale pour gagner les ganglions lymphatiques régionaux, puis la circulation sanguine (FIGURE 5). Les monocytes véhiculent et libèrent les bactéries dans la circulation. Le foie et la rate sont les organes cibles pour la multiplication bactérienne de *Listeria*. Si le sujet est immunocompétent, le système immunitaire contrôle l'infection qui est inapparente.

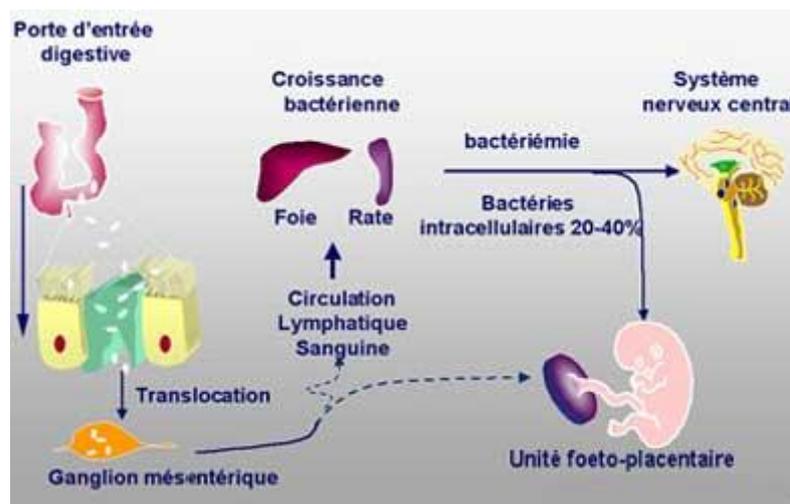


Figure 5 : Voies de contamination par *L. monocytogenes* (BERCHE, 1999)

Cependant, si l'inoculum a été massif ou chez certains sujets fragilisés ou immunodéficients, l'infection ne se limite plus à l'intestin, la rate et le foie ; les bactéries sont libérées dans la circulation sanguine, pouvant ainsi coloniser le placenta et le système nerveux central. Chez la femme enceinte, en particulier après le 5ème mois, *L. monocytogenes* colonise le placenta avec formation de nombreux granulomes inflammatoires, ce qui provoque une chorio-amniotite (infection inflammatoire de l'amnios) et l'infection de l'enfant in utero (90% des cas). Plus rarement, l'enfant peut être contaminé à la naissance (< 10% des cas).

2.3.3 Epidémiologie

La listériose est une maladie rare (1-5 cas / million d'habitants). Elle n'est pas décrite dans les pays pauvres. En France, on dénombrait en 1997 environ 225 cas/an, en Angleterre, 100-150 cas/an et aux USA 1500 cas/ an.

La contamination humaine est d'origine alimentaire. Certains aliments sont à risque : charcuteries (pâté, rillettes, langue de porc, bifteck haché ...), certains produits laitiers (fromages au lait cru ...), certains poissons fumés (saumon...), certains végétaux (soupe de choux, soja...). Les aliments qui induisent des listérioses sont souvent contaminés à fort taux (>105/g).

La transmission alimentaire est liée au caractère ubiquiste et saprophyte de la bactérie (sol, végétaux...) qui contamine fréquemment à faibles doses l'alimentation. La population est fréquemment exposée à faibles doses, ce qui explique un portage digestif (1-10% de la population) avec un portage intermittent touchant jusqu'à 70% de la population. Fait capital, cette bactérie a une température de croissance entre 3°C et 45°C, avec optimum 30-37°C (la température de 4°C est utilisée comme procédé d'enrichissement). Cette capacité de croître lentement à basse température explique la fréquence des contaminations alimentaires qui sont amplifiées par un long séjour au froid avant consommation. Bien que non sporulée, cette bactérie est relativement résistante en milieux hostiles en présence de NaCl (10%) , de bile 40%, ou de tellurite de potassium (0,5 %) ou autres antiseptiques. Cependant, la bactérie est facilement détruite par la chaleur 30 min à 55°C, 1-2 min à 100°C. Elle supporte des pH de 5,6-9,6 (pH optimum 7,2-7,6), mais est très sensible à pH acide (pas de contamination des yaourts).

Les animaux comme les hommes sont infectés par l'alimentation (ensilages...). Le portage fécal est estimé à 10-30%. Les sujets à risque sont les femmes enceintes pendant toute la grossesse et les immunodéprimés ou fragilisés par un maladie sous-jacente: personnes atteintes d'hémopathies, de SIDA, de cancers solides, de maladies hépatiques (cirrhose, hémochromatose), personnes hémodialysées, transplantées d'organe ou de moelle, diabétiques ou alcooliques...). Les sujets âgés bien portants

n'ont pas un risque beaucoup plus élevé que celui de la population générale. Les enfants même jeunes ont un risque identique, voire plus faible que celui de la population générale.

La maladie évolue par cas sporadiques plus fréquents à la fin de l'été et à l'automne, ponctués par des épidémies meurtrières liées à l'absorption d'aliments contaminés (charcuterie, fromages, produits laitiers, salade de choux...). De nombreuses épidémies ont été rapportées dans le monde. (Cf Paragraphe 2.1)

En France, selon les chiffres du Centre National de Référence des *Listeria* :

- 801 cas de listériose ont été recensés en 1986
- 301 cas ont été décrits en 1995
- Entre 1996 et 1998, ce nombre de cas descend entre 220 et 230 par an.
- En 1998, seuls des cas sporadiques (20% de formes périnatales et 80% de formes non périnatales) ont été notés. L'incidence de la listériose humaine invasive a été de 3.8 cas par million d'habitants, variant suivant la région de 1.4 à 8.4 cas par million d'habitants.

Selon Robin et Roche du CHU de Lyon (2002), la maladie humaine est observée à tous les âges avec cependant 3 pics :

- Avant 1 an : listériose néo-natale
- Entre 20 et 40 ans : cas maternels d'infection materno-fœtale
- Entre 60 et 80 ans.

Enfin, de nombreux problèmes subsistent en ce qui concerne la présence de *Listeria* dans les aliments. 70 à 90% des souches isolées d'aliments appartiennent au sérotype 1/2a, alors que la majorité des souches isolées des cas sporadiques appartiennent au sérotype 4b. L'analyse fine des souches isolées d'une part, des entreprises de transformation et d'autre part des aliments, suggère que certaines souches s'adaptent à l'environnement industriel, et sont capable d'y persister et de contaminer des denrées.

L'identification de l'aliment responsable d'infections est souvent délicate car la période d'incubation, généralement comprise entre 3 et 4 semaines, peut parfois atteindre 70 jours. De plus, les aliments sont fréquemment contaminés par différentes

souches, les contaminations croisées sont possibles chez les détaillants ou chez les consommateurs, un même lot de produit peut être distribué sous des dénominations commerciales différentes (Forum FAO OMS Marrakech, 2002)

Un aliment, même contaminé, n'est pas toujours dangereux. En effet les résultats des dénombrements dans les aliments montrent que les cas de listériose humaine sont généralement dus à un aliment contaminé avec plus de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme ou par millilitre. Ce fait suggère que seules les denrées fortement contaminées présentent un risque réel. Toutefois, lors d'une épidémie décrite en 1999 en Finlande, 12 des 13 échantillons de l'aliment contaminé, du beurre pasteurisé en l'occurrence, contenaient moins de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme. Cette épidémie présentait également deux autres originalités :

- La souche appartenait au sérovar 3a qui n'avait encore jamais été impliqué dans des infections alimentaires collectives
- L'aliment contaminé était du beurre, denrée alimentaire très rarement impliquée (Rapport du CODEX Sur l'hygiène alimentaire, Buenos-aires, 2005)

Les produits les plus sensibles sont ceux qui peuvent favoriser la croissance des *Listeria*, qui ont une longue durée de vie et qui peuvent être consommés sans être chauffés (lait cru, produits laitiers, charcuteries et produits de la pêche).

Selon une enquête de la DGCCRF, environ 5% des aliments sensibles étaient contaminés en 2001 au moment de leur distribution (DGCCRF, 2002). En revanche, les produits stérilisés et notamment les conserves (par exemple, les charcuteries en conserve) sont totalement indemnes de *Listeria* avant ouverture (Rapport du CODEX sur l'hygiène alimentaire, Washington, 2004)

La contamination peut intervenir à tous les stades de la fabrication et de la distribution, mais elle peut aussi se produire chez le consommateur. La prévalence de l'infection est faible (5 à 10 cas par million d'habitants pour la France par exemple) mais la mortalité atteint les 30%.

La listériose de l'homme est présente dans les pays industrialisés mais il semble qu'elle soit quasi absente des pays en voie de développement. Outre les différences existant dans les moyens de diagnostic et de surveillance sanitaire, cette répartition géographique s'expliquerait par une meilleure hygiène et par une généralisation de la chaîne du froid dans les pays développés. En effet, et cela peut paraître paradoxal, il

semble que ce soit la bonne hygiène des procédés de fabrication et le développement de la chaîne du froid qui soient à l'origine d'une augmentation des cas de listériose observées depuis une quarantaine d'années (Forum FAO OMS Marrakech, 2002).

L'amélioration des conditions sanitaires sur les lieux de transformation des denrées alimentaires a pour conséquence une réduction de la contamination par les flores d'altérations. Si on associe à cela une réfrigération systématique, la date limite de consommation des aliments augmente. L'aliment qui au départ ne contenait que quelques *Listeria monocytogenes*, les verra se multiplier d'autant plus facilement que leur multiplication n'est pas entravée par d'autres proliférations microbiennes. L'aliment devient donc fortement contaminé avec le temps, il est d'autant plus dangereux qu'il ne présente aucun signe d'altération visible. Bien sûr, un mauvais respect de la chaîne du froid ou de mauvaises conditions de stockage (réfrigérateurs domestiques dont la température réelle dépasse les 4°C théorique) accroissent les risques.

2.3.4 Dose infectante

De nombreuses données épidémiologiques (BUCHANAN et al., 2004) indiquent que de faibles doses de *L. monocytogenes* peuvent causer la listériose. À l'inverse, des évaluations quantitatives de l'exposition montrent que tous les consommateurs sont exposés, plusieurs fois dans l'année (Forum FAO OMS Marrakech, 2002), à de très hautes doses de *L. monocytogenes* dans les aliments dits « prêts à consommer ».

Le terme de dose minimale d'infection est une façon d'évaluer la capacité de la bactérie à provoquer la maladie, exprimé en quantité minimum de germes nécessaires.

Actuellement, toutes les souches de *L. monocytogenes* sont considérées comme virulentes mais aucun marqueur biologique n'a été élaboré pour détecter cette virulence ou la susceptibilité de l'hôte à répondre à la bactérie.

La plupart des contaminations résultent de l'ingestion d'aliments fortement contaminés, contenant de 10^3 *L. monocytogenes* au minimum et plus généralement plus de 10^6 bactéries dans 25 gr ou 25 ml de denrée alimentaire.

Expérimentalement, la dose minimale infectieuse par voie orale est de l'ordre de 10^8 *L. monocytogenes* pour la souris normale et de 10^9 pour des singes (AMGAR et al., 2004).

Réglementation en vigueur

Actuellement, *L. monocytogenes* est pris en compte dans les critères de sécurité du règlement (CE) N° 2073/2005 du 15 novembre 2005.

Les denrées alimentaires prêtes à être consommées, destinées aux nourrissons et celles destinées à des fins médicales spéciales ne doivent pas contenir de *L. monocytogenes* dans 25g.

Pour les denrées alimentaires autres que celles précédemment citées, et permettant le développement de *L. monocytogenes*, le critère est également « absence dans 25g » sauf si le fabricant apporte la preuve que le nombre de *Listeria* au stade de la distribution et pendant toute la DLUO (Date limite d'utilisation optimale) est inférieur à 100 par gramme de produit. La preuve peut être apportée par une étude de vieillissement ou de croissance.

Les aliments prêts à être consommés, ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes*, doivent respecter une limite de 100 *Listeria* par millilitre ou gramme de produit pendant la durée de conservation.

2.3.5 Traitement

Le traitement consiste en une antibiothérapie. Celle-ci doit être administrée le plus tôt possible. Un grand nombre d'antibiotiques sont actifs sur *Listeria*, mais les pénicillines (Pénicilline G® et ampicilline), éventuellement avec un aminoside (gentamicine) sont considérés comme la combinaison de choix. Pour les patients allergiques aux pénicillines, ou avec des pathologies concomitantes, on pourra utiliser en deuxième intention le triméthoprime/sulfaméthoxazole, l'érythromycine, la vancomycine, et les fluoroquinolones (TEMPLE et NAHATA, 2000).

Les céphalosporines ne sont pas actives contre *L. monocytogenes*.

De rares souches résistantes à un ou plusieurs antibiotiques ont été décrites, notamment au triméthoprime, au chloramphénicol, à l'érythromycine, à la

streptomycine, à la kanamycine, à la rifampicine, la résistance la plus fréquente demeurant celle à la tétracycline.

L'efficacité du traitement dépend essentiellement de sa précocité. Le diagnostic de la listériose repose sur l'isolement de *L. monocytogenes* à partir d'un site normalement stérile, généralement le sang, le liquide céphalo-rachidien ou le placenta.

Il n'existe malheureusement aucun vaccin, ni aucune prophylaxie.

2.3.6 Population à risques

La listériose survient préférentiellement chez les sujets dont le système immunitaire est perturbé, soit naturellement (nouveau-nés, femmes enceintes, personnes âgées), soit en raison d'une maladie (SIDA et séropositivité au VIH, cancers), soit en raison de traitements (corticothérapie, chimiothérapie).

2.4 Mise en évidence dans les denrées alimentaires.

Le choix de l'échantillon est primordial quelle que soit la technique d'isolement utilisée, et son traitement conditionne en grande partie le succès de la recherche (BIND, 1990).

2.4.1 Echantillonnage et traitement de l'échantillon

2.4.1.1 Contamination

La contamination du produit peut intervenir à n'importe quel stade de fabrication ou de commercialisation du produit, voir même chez le consommateur.

De même, un produit peut n'être contaminé qu'à certains endroits, comme la croûte d'un fromage par exemple.

Et enfin, un produit peut être contaminé par plusieurs groupes, sérotype ou lysotypes de *Listeria*.

2.4.1.2 Traitement de l'échantillon

Le principe de mise en évidence que nous évoquerons est celui de la norme AFNOR NF V 08 055, officiellement utilisée à l'heure actuelle.

Les compositions de tous les milieux de cultures cités sont disponibles en Annexe 1.

Revivification

Les *Listeria* peuvent avoir subi des agressions dues à la préparation des aliments (chauffage, pH, etc.), il est alors indispensable de revivifier les germes si on veut avoir toutes les chances de les isoler.

Une étape de pré enrichissement en milieu peu sélectif est recommandée :

- Milieu UVLMI sans agent sélectif, 24h à 30°C
- Bouillon Columbia, 6h à 20°C

Cette étape n'est pas obligatoire, mais elle contribue grandement à isoler les *Listeria* qui ont subi des stress lors de la fabrication du produit.

Echantillonnage

Pour un fromage par exemple, la recherche de *Listeria* s'effectue sur 25 gr. Le prélèvement s'effectue sur cinq fromages du même lot, soit 5 grammes par fromage, en traversant toute l'épaisseur du fromage avec une sonde sans éliminer la croûte. A ces 25gr sont ajoutés 225ml de bouillon d'enrichissement sélectif.

A noter qu'un ajustement à pH=7 permet d'isoler plus facilement les *Listeria* dans les produits acides, comme les produits laitiers et fromagers.

2.4.2 Enrichissement

Enrichissement primaire

Ensemencement du bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (formule Fraser-demi) avec le prise d'essai, puis incubation a 30°C pendant 18 à 24h.

Isolement de l'enrichissement primaire

Il est réalisé sur gélose d'Oxford ou de PALCAM à partir de la culture obtenue précédemment.

Sur gélose Oxford, les colonies de *Listeria* apparaissent noires et entourées d'un halo noir.

Sur gélose PALCAM, les colonies de *Listeria* sont de couleur vert-marron foncé, leurs centres apparaissent enfoncés dans la gélose et elles sont entourées d'un halo noir (hydrolyse de l'esculine). Eau distillée : 10,0mL

Enrichissement secondaire en milieu sélectif liquide

Il est réalisé par inoculation de 0.1 ml de l'enrichissement primaire dans 10ml de bouillon d'enrichissement pour *Listeria* (Formule Fraser), puis incubation à 37°C pendant 18 à 24h.

Isolement de l'enrichissement secondaire

A partir de la culture obtenue après enrichissement secondaire, et à la fin de la période d'incubation, ensemencement de l'une des deux géloses : Oxford ou Palcam.

Examen des milieux d'isolement

Après 18 à 24h, voir même 48h si nécessaire, d'incubation à 37 °C, on recherche la présence de colonies caractéristiques sur les géloses, présumées être des *Listeria*.

On cherchera la confirmation

Du genre *Listeria* par les caractères :

- catalase +
- Gram + (Bâtonnets)

De l'espèce par les caractères :

- Mobilité
- Hémolyse de type β ou Camp-test sur gélose TSA au sang, le Camp-test permettant sur gélose au sang de comparer le pouvoir hémolytique de la bactérie étudiée vis-à-vis de *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* qui est β hémolytique.
- Les différents critères biochimiques, pouvant être regroupés par l'utilisation d'une galerie biochimique de type API – *Listeria*, qui donne un résultat en 24 heures sans utilisation de Camp-Test (Figure 6).



Figure 6 : Galerie API *Listeria*, Laboratoire Biomerieux

2.4.3 Isolement des *Listeria* dans les aliments selon la méthode "Rapid'L.Mono"

C'est un test commercialisé par Sanofi Diagnostic Pasteur, qui a été validé par l'AFNOR (AFNOR-ISO 16140).

Cette technique utilise un milieu gélosé sélectif permettant une identification en 24-48 heures après l'étape de pré enrichissement. Le milieu Rapid'L.Mono permet la détection chromogénique d'une phospholipase C produite par *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* et une différenciation de ces deux espèces basées sur la capacité d'acidification du xylose.

Vingt cinq grammes d'échantillon sont placés dans 225 mL de bouillon d'enrichissement de Fraser "demi" et broyés au Stomacher. Le bouillon est incubé 24 heures à 30 °C puis isolé sur gélose Rapid'L.Mono. Un aliquote (0,1 mL) du bouillon Fraser "demi" est ensemencé dans 10 mL de bouillon d'enrichissement Fraser incubé 48 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation le bouillon d'enrichissement Fraser est isolé sur gélose Rapid'L.Mono.

Les milieux gélosés sont incubés à 37 °C et observés tous les jours durant 2 jours. Les colonies de *Listeria monocytogenes* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) sans halo jaune (absence d'acidification du xylose). Les colonies de *Listeria ivanovii* apparaissent bleues (synthèse de phospholipase C) entourées d'un halo jaune (acidification du xylose). Les colonies des autres espèces sont blanches (absence de synthèse de phospholipase C), entourées d'un halo jaune (*Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*) ou dépourvues d'un halo jaune (*Listeria grayi*, *Listeria innocua*) (Figure 7).



Figure 7 : Test Rapid'L Mono : Mise en évidence des différents serotypes de *Listeria* (RAPIDMICROBIOLOGY)

2.4.4 Sérotypage

En France, l'utilisation de la sérotypie est d'intérêt limité puisque plus de 95% des souches isolées des infections cliniques appartiennent au sérovar 1/2a, 1/2b ou 4b.

Selon l'Institut de Veille sanitaire, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments et le Centre National de Référence des *Listeria*, la sérologie est soit trop peu sensible, soit trop peu spécifique pour apporter à l'heure actuelle une aide au diagnostic.

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

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

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

2.4.5.1 Principe

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

- Préparation de la suspension mère dans un diluant.
- Revivification pendant une heure à 20°C.
- Inoculation en surface du milieu sélectif solide coulé dans deux boîtes de Pétri, à raison de 0.1ml par plaque.
- Incubation des boîtes à 35 ou 37°C et examen après 24 à 48 heures.
- Confirmation des colonies présumées de *Listeria monocytogenes*.
- Calcul du nombre de *Listeria monocytogenes* à partir du nombre de colonies confirmées par gramme ou par millilitre.

2.4.5.2 Mode opératoire

Le mode opératoire nécessite six étapes successives parmi lesquelles :

Prise d'essai, suspension mère et dilutions.

Pour préparer la suspension mère, utiliser comme diluant :

- Soit de l'eau peptonée tamponnée
- Soit le milieu de base du bouillon Fraser au demi sans addition d'agents sélectifs : ce milieu peut être utilisé comme diluant pour le produit alimentaire si la méthode de recherche (ISO 11290-1) et la méthode de dénombrement sont effectuées sur le même échantillon pour essai. Cette opération permet d'éviter la préparation de deux suspensions mères. Les agents sélectifs ne sont ajoutés à la suspension mère qu'après la prise d'essai pour dénombrement.

Laisser reposer la suspension mère pendant une heure (± 5 min) à 20°C en utilisant si nécessaire une étuve afin de revivifier les microorganismes stressés.

Si une gamme de dilution est utilisée, la préparer après revivification.

Inoculation et incubation

A l'aide d'une pipette stérile, transférer 0.1ml de la suspension mère à la surface de chacune des boîtes contenant de la gélose PALCAM ou OXFORD (fondue, refroidie, additionnée des agents sélectifs correspondants, coulée en boîtes puis séchée). Répéter l'opération avec les dilutions suivantes à l'aide de nouvelles pipettes, comme le montre la figure 8.

Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface de la gélose en essayant de ne pas toucher les bords de la boîte avec l'étaleur. Utiliser un étaleur stérile à chaque boîte.

Laisser les boîtes fermées pendant environ 15 minutes à la température ambiante pour permettre à l'inoculum d'être absorbé dans la gélose. Retourner les boîtes et les incuber à l'étuve à 35 ou à 37 °C soit en atmosphère aérobie, soit en atmosphère micro aérobie dans une jarre contenant un mélange gazeux.

Dénombrement des colonies caractéristiques.

Après incubation pendant 24 heures, et 18 à 24 heures supplémentaires, si le développement est faible ou si aucune colonie n'est observée après 24 heures

d'incubation, examiner les boîtes afin de rechercher la présence de colonies présumées être des *Listeria spp.*

Dans le cas d'une incubation en atmosphère micro aérobie, après incubation, laisser la gélose retrouver sa couleur pourpre en laissant les boîtes de gélose PALCAM à l'air libre pendant une heure.

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

Après 48 heures d'incubation, les *Listeria* se présentent sous forme de colonies vertes de 1.5 à 2 mm de diamètre avec une dépression centrale et entourées d'un halo noir. Compter alors toutes les colonies présumées être des *Listeria spp* pour chacune des boîtes contenant au moins 150 colonies caractéristiques et non caractéristiques.

Confirmation du Genre *Listeria spp.*

- Sélection des colonies pour la confirmation

Pour cela retenir les boîtes contenant au maximum 150 colonies présumées être des *Listeria spp* à toutes les dilutions et, si possible, au niveau de deux dilutions successives.

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

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

- Réaction à la Catalase

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

- Coloration de Gram

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

Confirmation de l'espèce *Listeria monocytogenes*

- Examen de la mobilité

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

Observer au microscope optique (grossissement 40) une goutte de ce bouillon entre lame et lamelle. *Listeria monocytogenes* apparaît sous forme de bacilles minces courts et animés d'une mobilité.

En alternative, on peut ensemencer à l'aide d'un fil droit une gélose mobilité à partir d'une colonie sur gélose TSYEA, à incuber à 25°C pendant 24 à 48 heures. *Listeria monocytogenes* donne une culture atypique sous forme d'un parapluie immédiatement sous la surface de la gélose.

- Recherche de l'hémolyse

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

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

- Utilisation des glucides.

A partir du bouillon TSYEB, inoculer des bouillons contenant les sucres à étudier. Ces bouillons seront alors incubés à 35 ou à 37°C jusqu'à 5 jours.

L'identification de *Listeria monocytogenes* peut se faire également à l'aide de la galerie miniaturisée API-*Listeria* (figure 6).

De plus, la présence de *L. innocua* peut masquer la présence de *L. monocytogenes*. En effet, *L. innocua* bénéficie d'un taux de croissance plus rapide (CURIALE M.S. et LEWUS C., 1994). Seul une méthode associant un milieu sélectif et deux incubations successives (24h à 37°C et 5 mois à -4°C) permet de récupérer un plus grand nombre de souches de *L. monocytogenes*. Il va de soit que l'enrichissement préconisé par les normes ISO et AFNOR favoriserait plutôt la détection de *L. innocua* au détriment de *L. monocytogenes*. Ne trouver que *L. innocua* ne signifie donc pas que *L. monocytogenes* n'est pas présente.

2.4.5.3 Expression des résultats

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

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

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

A est le nombre de colonies repiquées en vue de l'identification

C est le nombre total de colonies dénombrées sur la boîte

Arrondir à un nombre de colonies calculé à deux chiffres significatifs

Exemple :

Prenons un dénombrement de *Listeria* dans un produit liquide ayant donné les résultats suivants :

- A la première dilution retenue (10⁻¹) : 44 et 60 colonies
- A la seconde dilution retenue (10⁻²) : 16 et 8 colonies

Ont été repiqués :

- Pour 44 colonies, 5 colonies dont 3 ont répondues aux critères d'où

$$a = \frac{3}{5} * 44 = 27$$

- Pour 60 colonies, 5 colonies dont 2 ont répondues aux critères, $a = 24$
- Pour 16 colonies, 5 colonies dont 4 ont répondues aux critères ; $a = 13$
- Pour 8 colonies, 5 colonies dont 2 ont répondues aux critères, $a = 3$

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

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

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

V est le volume d'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitre

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution

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

Comme précédemment, arrondir les résultats à deux chiffres significatifs.

Le résultat N du nombre de microorganismes par millilitre (pour les produits liquides) ou par gramme (produit solide) sera exprimé entre 1 et 9,9 multiplié par la puissance de 10 appropriée.

Poursuite de l'exemple précédent

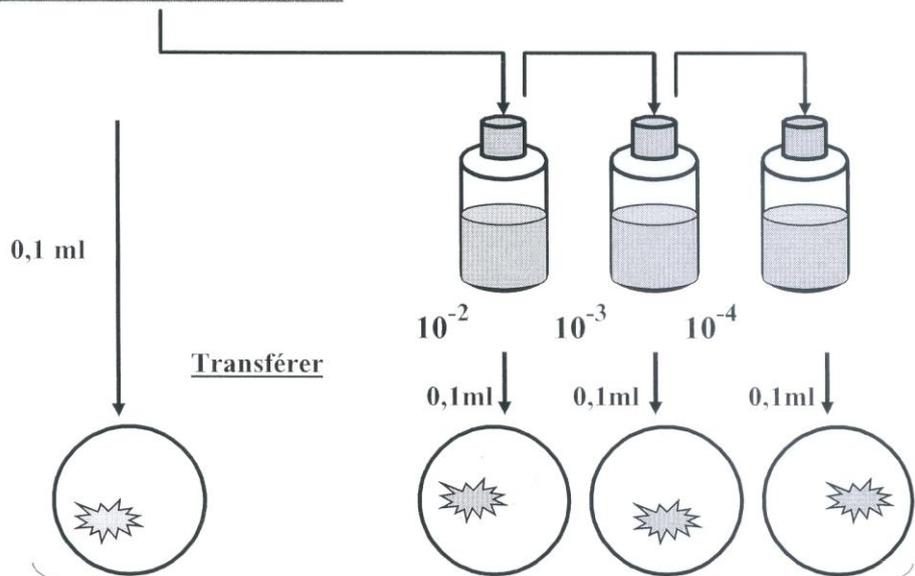
$$N = \frac{27 + 24 + 13 + 3}{0,1(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-1}} = \frac{67}{0,022} = 3045454$$

En arrondissant le résultat, on trouve 3045 exprimé $3 \cdot 10^3$ microorganismes par ml de produit ou $3 \cdot 10^3$ UFC/ml.



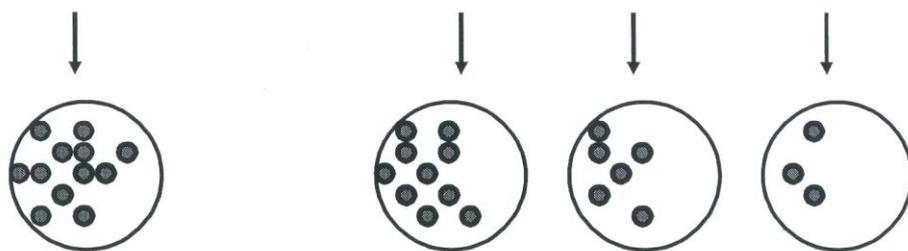
$$SM = 10^{-1}$$

1 heure \pm 5 minutes à 20°C



Etallement

Attendre 5 minutes à température ambiante
Incuber à 35 ou à 37°C, pendant 24 à 48 heures,
en atmosphère aérobie ou en atmosphère micro aérobie



Dénombrer les colonies au niveau de deux dilutions successives
Identifier puis calculer la valeur de a puis de N.

Figure 8 - La méthode ISO 11290-2

2.5 Classification des aliments du point de vue du risque lié à la présence de *L. monocytogenes*

Les données de l'AFSSA ont permis de classer les aliments en 3 catégories. (AFSSA, 2003)

Les aliments subissant un traitement thermique, ou tout autre procédé, sont exclus, du moment que ce traitement est réalisé dans leur emballage ou préalablement à un conditionnement sans contamination possible jusqu'à l'ouverture par le consommateur.

Catégorie 1

Cette catégorie regroupe les aliments qui nécessitent soit une cuisson, soit une transformation efficace pour éliminer ou ramener à un niveau convenable les micro-organismes dangereux. Les informations communiquées aux consommateurs quant à la préparation et la conservation de ces produits sont essentielles.

Les habitudes alimentaires différentes d'un individu à l'autre et d'une région à une autre, doivent attirer l'attention, et devraient avoir des conséquences sur l'étiquetage ou sur l'exigence d'hygiène lors de la fabrication en fonction du pays de destination.

Par exemple, la viande hachée entre dans cette catégorie quand elle est cuite à cœur, mais devrait ne pas rentrer dans cette catégorie si on sait qu'elle sera consommée crue.

Catégorie 2

Ces denrées alimentaires prêtes à être consommées ne contiennent *pas* *L. monocytogenes* à un taux supérieur au taux fixé réglementairement lors de leur mise sur le marché, de plus elles ne permettent pas sa multiplication.

C'est le cas notamment :

- si le pH est inférieur à 4.2
- si le produit est sous forme congelée ou surgelée
- si la preuve de la non croissance peut être apportée expérimentalement
- si la preuve de non croissance est apportée par des données scientifiques publiées et/ou par tout autre moyen fourni par les professionnels (historique par exemple)

Catégorie 3

La catégorie regroupe les denrées alimentaires prêtes à être consommées et dans lesquelles *L. monocytogenes* peut se multiplier. La sécurité sanitaire et la conformité aux critères microbiologiques de ces produits dépendent à la fois :

- de l'application des bonnes pratiques d'hygiène tout au long de la chaîne de production jusqu'à la consommation.
- du respect de la durée de conservation
- des informations destinées au consommateur (Usage prévu, étiquetage avec température de conservation, durée de conservation)

Pour cette catégorie, les aliments subissant des ruptures de la chaîne du froid, voir e une décongélation, sont à surveiller particulièrement.

Pour tous les aliments, dès l'instant où l'emballage est ouvert, il existe un risque d'apport de *L. monocytogenes*. Il existe des guides de bonne pratique d'hygiène permettant aux détaillants de maîtriser ce risque. La probabilité de contamination est évidemment plus faible pour les aliments que l'on conserve dans leur préemballage après ouverture. L'ajout d'une mention « après ouverture, conserver au froid et consommer rapidement » pourrait être envisagée dans de nombreux cas.

III

ETUDE STATISTIQUE ET EXPLOITATION DES RESULTATS

3 Etude statistique et exploitation des résultats

3.1 Données relatives à *Salmonella*

3.1.1 Résultats positifs à *Salmonella*.

3.1.1.1 Résultats positifs dans les aliments

La recherche par le LVAD des prélèvements positifs à *Salmonella* toutes sous-espèces confondues sur la période allant de 2003 à 2007 nous a permis d'établir la liste suivante.

Elle est constituée par les matrices exactes échantillonnées, le sérotype de *Salmonella* trouvé, et la catégorie d'aliment à laquelle la matrice est censée appartenir.

2003

4000 recherches ont été effectuées sur les denrées alimentaires quant à la présence de *Salmonella* par le LVAD cette année la.

Langue de porc – *S. Typhimurium* - Produit carné

Langue de porc – *S. Derby* - Produit carné

Fuseau lorrain - *S Typhimurium* - Charcuterie

2004

4000 recherches ont été effectuées sur les denrées alimentaires quant à la présence de *Salmonella* par le LVAD cette année la.

Poitrine marinée – *S. Derby* - Produit carné

Merguez - *S. Typhimurium* - Produit carné

Chipolatas – *S. Typhimurium* - Produit carné

Pieds de porc panés cuits – *S. Derby* - Produit carné

Chair porc/veau (farce) – *S. Derby* - Produit carné

Escalope – *S. St Paul* - Produit carné

2005

4000 recherches ont été effectuées sur les denrées alimentaires quant à la présence de *Salmonella* par le LVAD cette année la.

Farce à la tomate – *S. Agona* - Produit carné

Filet de canette farci/gésier de canard – *S. Indiana* - Produit carné + ovoproduit

Alouette de bœuf – *S. Hadar* - Produit carné

Foie gras de canard - *S. Enteritidis* - Produit carné

Paté de poulet cru – *S. Enteritidis* - Charcuterie

Filet de poulet bistro à l'alsacienne - *S. Infantis* - Produit carné

2006

4000 recherches ont été effectuées sur les denrées alimentaires quant à la présence de *Salmonella* par le LVAD cette année la.

Escalope de porc - *S Typhimurium* - Produit carné

Emincé de volaille - *S Anatum* - Produit carné

Langue de porc - *S Typhimurium* - Produit carné

2007

4000 recherches ont été effectuées sur les denrées alimentaires quant à la présence de *Salmonella* par le LVAD cette année la.

Filet de poulet - *S Entertiidis* - Produit carné

Tourte au canard surgelée - *S Typhimurium* - Produit carné + ovoproduit

Saucisse à rôtir - *S Minnesota* - Produit carné

3.1.2 Exploitation des résultats

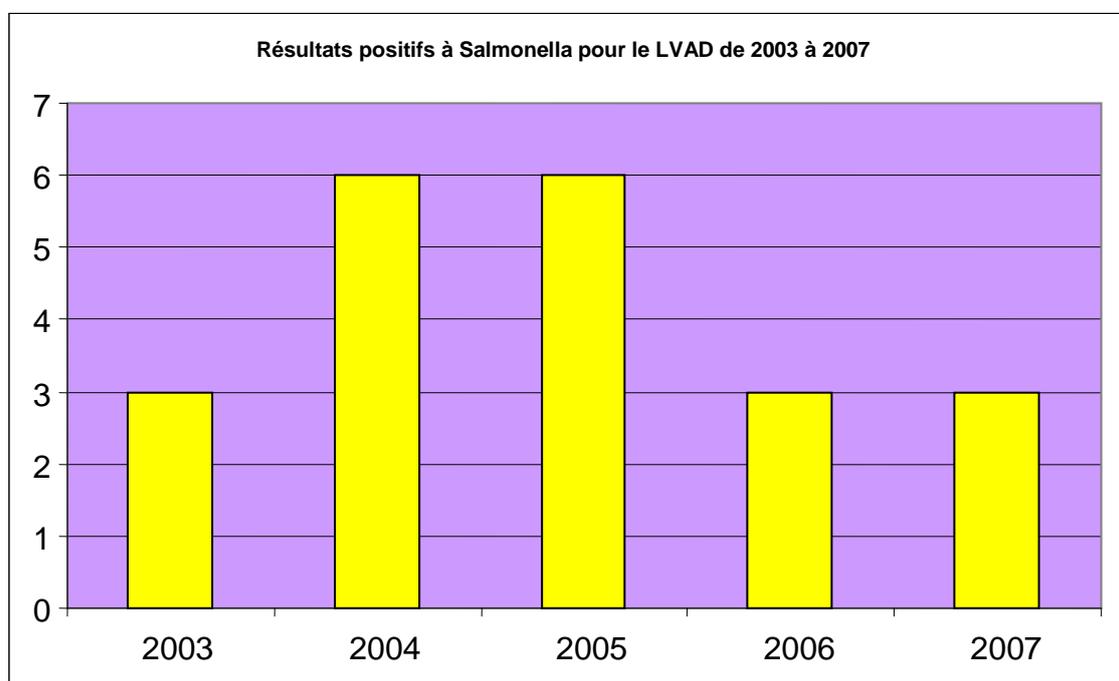


Figure 9 : Résultats positifs à *Salmonella* dans les analyses effectuées par le LVAD sur la période 2003-2007

En 2003, le LVAD a mis en évidence 3 résultats positifs.

En 2004 et 2005, 6 prélèvements sont sortis positifs des analyses.

Enfin en 2006 et 2007, 3 analyses ont révélés la présence de *Salmonella*.

Le nombre d'analyses effectuées par le LVAD pour la recherche de *Salmonella* spp. est resté constant sur la période, avec 4000 recherches par an.

Ces recherches ont mis en évidence des *Salmonella* uniquement dans les produits alimentaires, le LVAD n'ayant pas mis en évidence de *Salmonella* dans les environnements de production.

Le LVAD ne nous a pas fourni malheureusement les données concernant les prélèvements environnementaux et si de tels prélèvements avaient eu lieu.

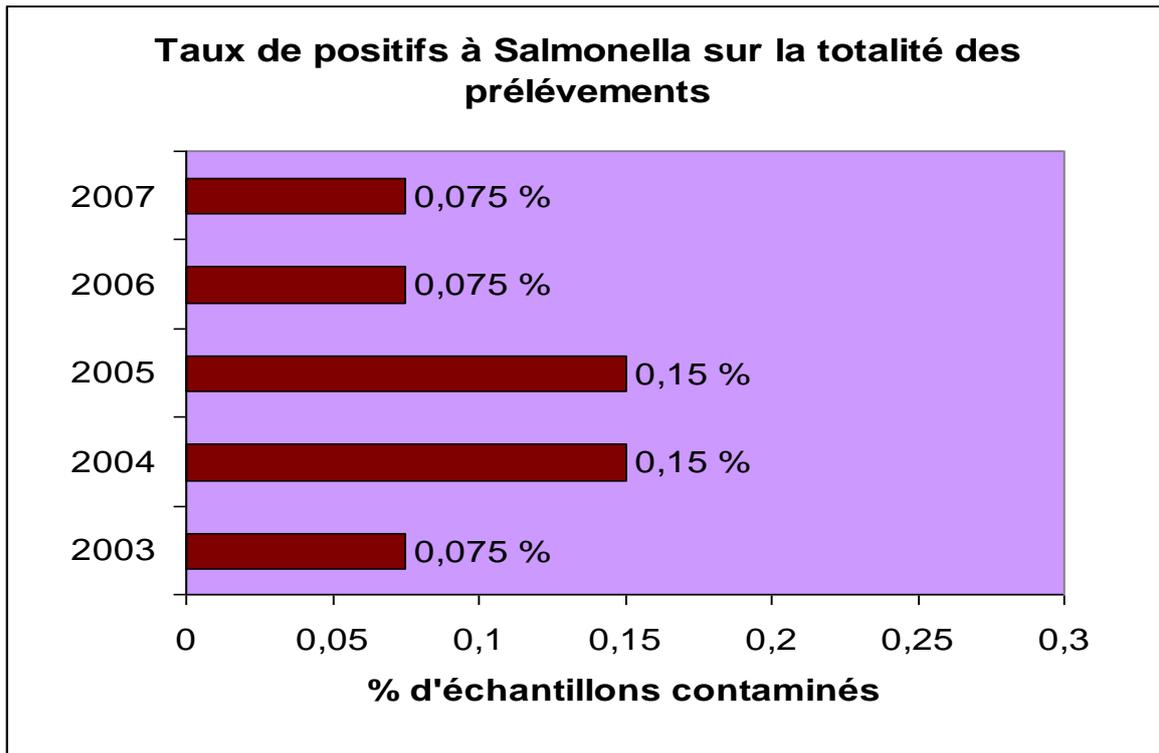


Figure 10 : Proportion de résultats positifs à *Salmonella* par rapport au nombre de recherches total.

Le nombre de recherches est resté constant sur la période allant de 2003 à 2007. Si l'on considère que les prélèvements n'ont exclusivement eu lieu que sur des denrées alimentaires, on peut calculer l'incidence annuelle de *Salmonella* spp. dans les aliments testés.

Ainsi, on peut trouver que 4,2 aliments toutes matrices confondues sont positifs chaque année à *Salmonella* sur cette période (FIGURE 9).

Ce qui fait donc un taux de 0,1% de prélèvements positifs pour les aliments sensibles testés (FIGURE 10)

3.1.2.1 Sérotypes de Salmonella trouvés

Ils sont présentés dans le tableau 6.

	Recherche	Total	S Typhimurium	S Derby	S St Paul	S Agona
2003	4000	3	2	1		
2004	4000	6	2	3	1	
2005	4000	6				1
2006	4000	3	2			
2007	4000	3	1			
Total	20000	21	7	4	1	1

	S Enteritidis	S Hadar	S Infantis	S indiana	S Anatum	S Minesota
2003						
2004						
2005	2	1	1	1		
2006					1	
2007	1					1
Total	3	1	1	1	1	1

Tableau 6 : Répartition des sérotypes de *Salmonella* trouvés

En 2003, les sérotypes mis en évidence sont : *S. Typhimurium* à deux occasions, *S. Derby*.

En 2004, les sérotypes mis en évidence sont : *S. Derby* à trois reprises, *S. Typhimurium* découvert deux fois, *S. St Paul*.

En 2005, les sérotypes mis en évidence sont : *S. Enteritidis* deux fois, *S. Agona*, *S. Hadar*, *S. Infantis*, *S. indiana*.

En 2006, les sérotypes mis en évidence sont : *S. Typhimurium* à deux occasions, *S. Anatum*.

En 2007, les sérotypes mis en évidence sont : *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Minesota*.

Toutes les souches de *Salmonella* ont été identifiées.

Le sérotype le plus fréquent mis en évidence par le LVAD sur la période 2003/2007 est *S. Typhimurium* (32%), suivi de *S. Derby* (19%) et *S. Enteritidis* (14%) (Figure 11).

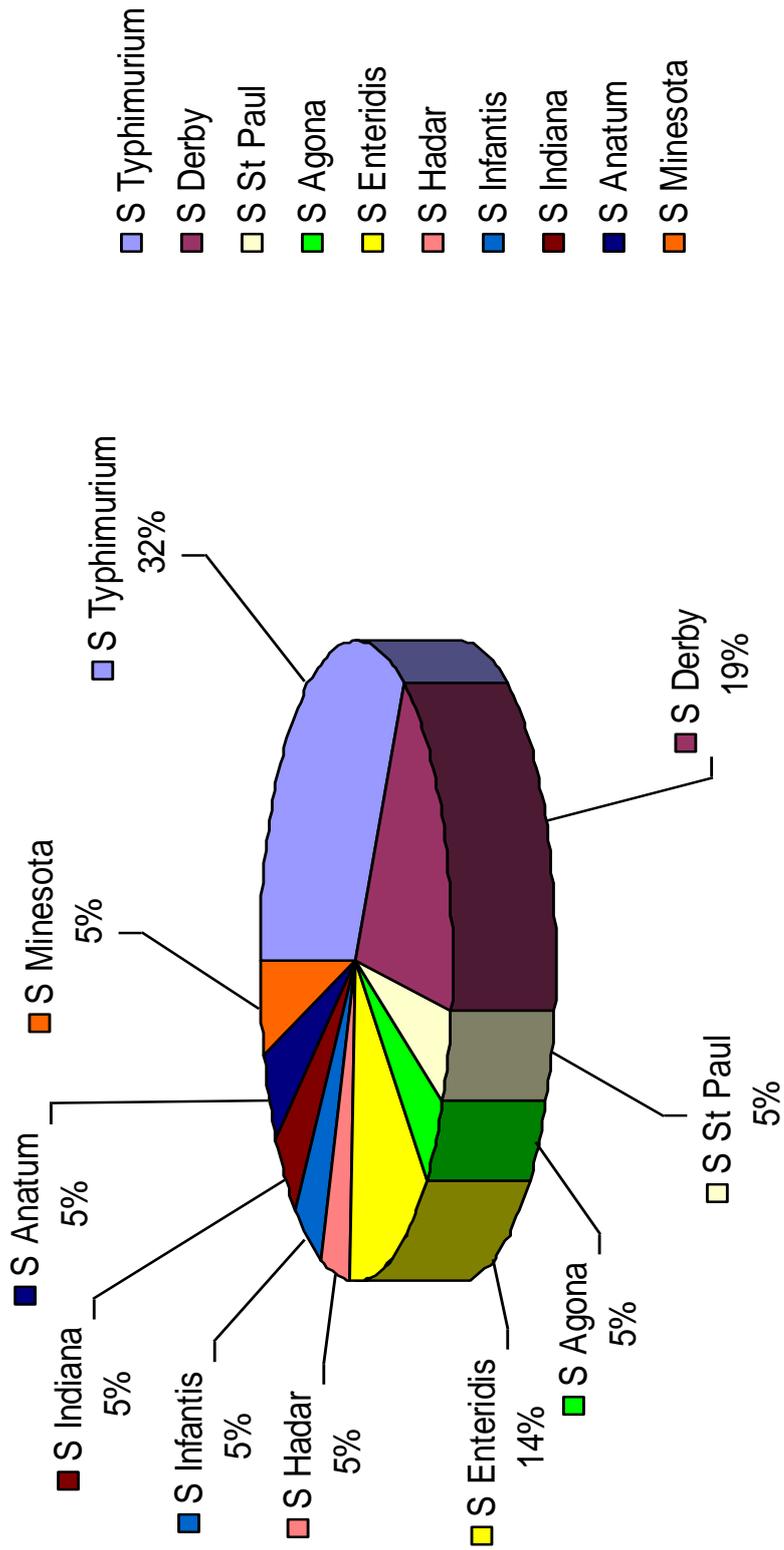


Figure 11 : Répartition des sérotypes de *Salmonella* trouvés par le LVAD sur la période 2003-2007

Si on compare avec les données du Centre National de référence des Salmonelles (GRIMONT et WEIL, 2007), *S. Typhimurium* et *S. Enteritidis* sont apparemment les sérotypes les plus répandus en France sur la période 2002/2006 en toxi-infection humaine. Cependant, le manque de données sur la présence des autres sérotypes dans les aliments ne permet pas de déterminer si les sérotypes comme *S. Derby* par exemple, moins retrouvé en pathologie humaine, mais relativement fréquent dans les prélèvements du LVAD, est moins pathogène ou si c'est simplement un aléa statistique.

3.1.2.2 Types d'aliments contaminés

En 2003, trois prélèvements étaient contaminés, dont deux produits carnés et un produit de charcuterie.

En 2004, six prélèvements étaient contaminés, six produits carnés exclusivement.

En 2005, six prélèvements étaient contaminés, dont quatre produits carnés, un produit de charcuterie et un produit composé (viande + farce contenant certainement de l'œuf).

En 2006, trois prélèvements étaient contaminés, trois produits carnés exclusivement.

En 2007, trois prélèvements étaient contaminés, dont deux produits carnés et un produit composé (viande + farce contenant certainement de l'œuf).

Cette répartition est résumée dans le tableau 7.

	Total	Produit carné	Charcuterie	Produit composé
2003	3	2	1	
2004	6	6		
2005	6	4	1	1
2006	3	3		
2007	3	2		1

Tableau 7 : Répartition des types de matrices contaminées

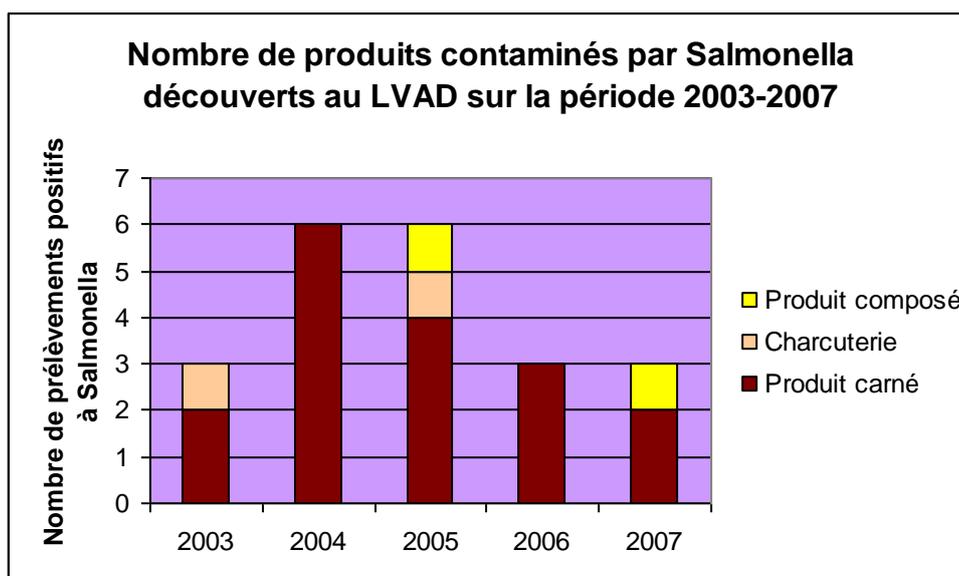


Figure 12 : Répartition des résultats positifs à Salmonella en fonction de la catégorie d'aliment.

On voit clairement que les produits carnés sont les plus fréquemment contaminés par *Salmonella* dans notre étude (FIGURE 12).

Etonnement, nous n'avons pas de produit à base d'œuf, mis à part deux produits composés, dont la composition pourrait éventuellement contenir de l'œuf.

Le type de viande ayant servi à fabriquer les produits retrouvés contaminés est repris tableau 8.

Porc	Volaille	Bœuf	Sans objet	Total
7	7	2	4	20

Tableau 8 : Origine des produits carnés contaminés à *Salmonella*

Dans nos produits carnés contaminés, 35% sont des produits à base de porc, et 35% à base de volaille (Figure 13).

Les saucisses, merguez, et escalope, de nature inconnue, ont été considérées comme sans objet.

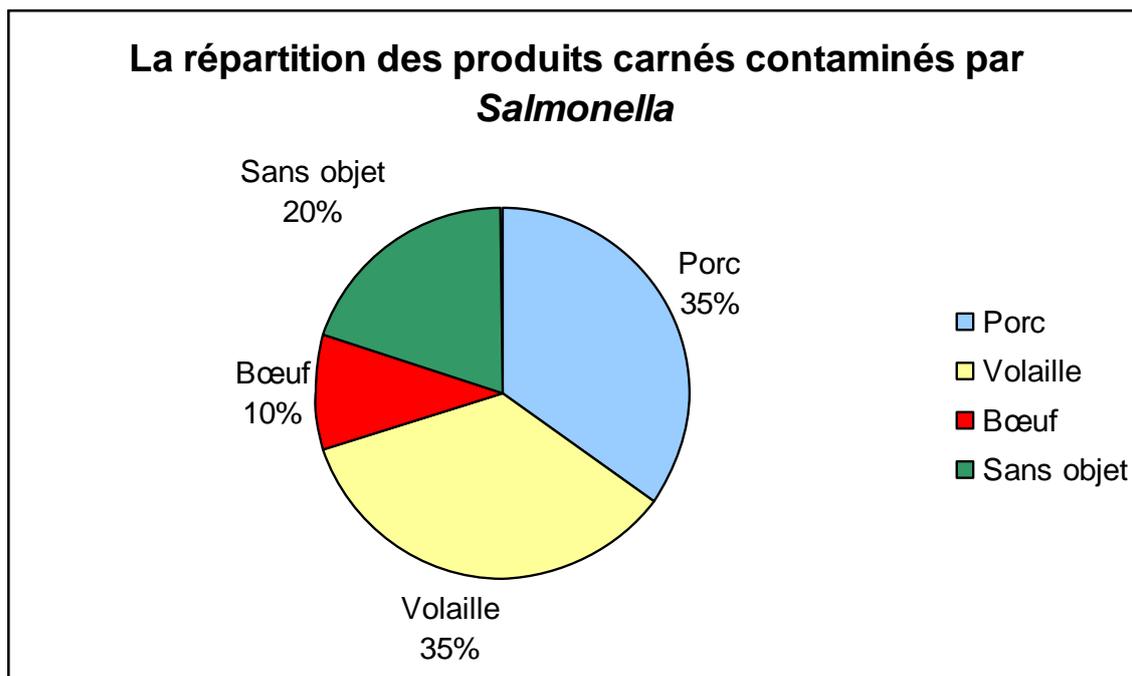


Figure 13 : Répartition des produits carnés contaminés par *Salmonella* en fonction de l'origine des viandes.

La volaille, et le porc, en particulier la langue de porc, sont donc les aliments les plus fréquemment contaminés par *Salmonella* en ce qui concerne les aliments analysés par le LVAD.

3.2 Données relatives à *Listeria monocytogenes*

3.2.1 Résultats positifs à *Listeria monocytogenes*

3.2.1.1 Résultats positifs dans les aliments

La recherche par le LVAD des prélèvements positifs à *Listeria* toutes sous-espèces confondues sur la période allant de 2003 à 2007 nous a permis d'établir une liste constituée par les matrices exactes échantillonnées, le sérotype de *Listeria* trouvé, et la catégorie d'aliment à laquelle la matrice est censée appartenir.

Année 2003

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

- Saumon fumé – *L. monocytogenes* 1/2a - Poisson
- Merguez bœuf mouton - *L. monocytogenes* 1/2a - Produit carné
- Viande à pâté (matière première) - *L. monocytogenes* 1/2a - Charcuterie
- Saumon – *L. monocytogenes* 1/2a - Poisson

Année 2004

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

- Farce à tomate – *L. monocytogenes* 1/2a - Produit carné
- Saucisse à rôtir - *L. monocytogenes* 1/2b - Produit carné
- Mirabelles surgelées – *L. monocytogenes* 1/2a - Fruit

Année 2005

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

- Mirabelles surgelées - *L monocytogenes 1/2a* - Fruit
- Brie de Melun - Fromage au lait cru - *Listeria spp*
- Truite fumée - Poisson - *Listeria spp*

Année 2006

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

Pas de résultat positif cette année là.

Année 2007

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

Chair à saucisse - Produit carné - *Listeria spp*

Saucisse à cuire fumée - Produit carné - *Listeria spp*

3.2.1.2 Résultats positifs dans l'environnement de production.

La chiffonnette n'est pas contrairement à ce que l'on pourrait penser un petit chiffon, mais plutôt l'abréviation de « chiffonnette de prélèvement », ce qui correspond au matériel de prélèvement d'échantillons de surface.

2003

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

Chiffonnette tranche côtelettes - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette sur plafond - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette Chambre froide Viande - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette sol Chambre froide Viande - *L. monocytogenes 1/2a*

2004

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année la.

Chiffonnette sol - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette sol de salle de coupe de viande - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette sol de cuisine - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette sol de couloir - *L. innocua 6a*

Chiffonnette sol de salle de préparation froide - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette roue d'échelle - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette roue de chariot à viande - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette roue de chariot à frites - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette dessous de chaussures - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette chambre froide à viande - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette sol - *L. monocytogenes 1/2c*

Chiffonnette lame tranche de côtelettes - *L. monocytogenes 1/2a*

Chiffonnette raclette de cuisine - *L. monocytogenes 1/2c*

2005

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année
la.

Pas de résultat positif cette année là.

2006

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année
la.

Pas de résultat positif cette année là.

2007

250 recherches ont été effectuées pour détecter la présence de *Listeria* cette année
la.

Chiffonnette bac gastro - *Listeria spp*

Chiffonnette hachoir - *Listeria spp*

3.2.2 Exploitation des résultats

Ils sont présentés sous forme d'histogrammes (FIGURE 14 et FIGURE 15) et représentent la prévalence de *Listeria* et le taux d'échantillons contaminés.

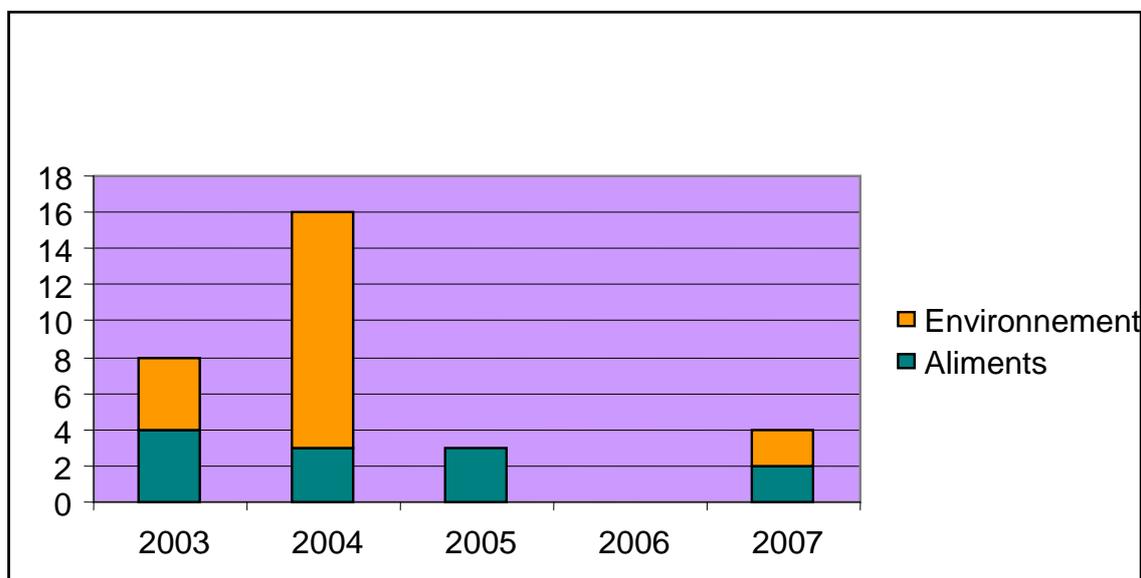


Figure 14 : Prévalence de *Listeria* dans les prélèvements effectués par le LVAD sur la période 2003-2007

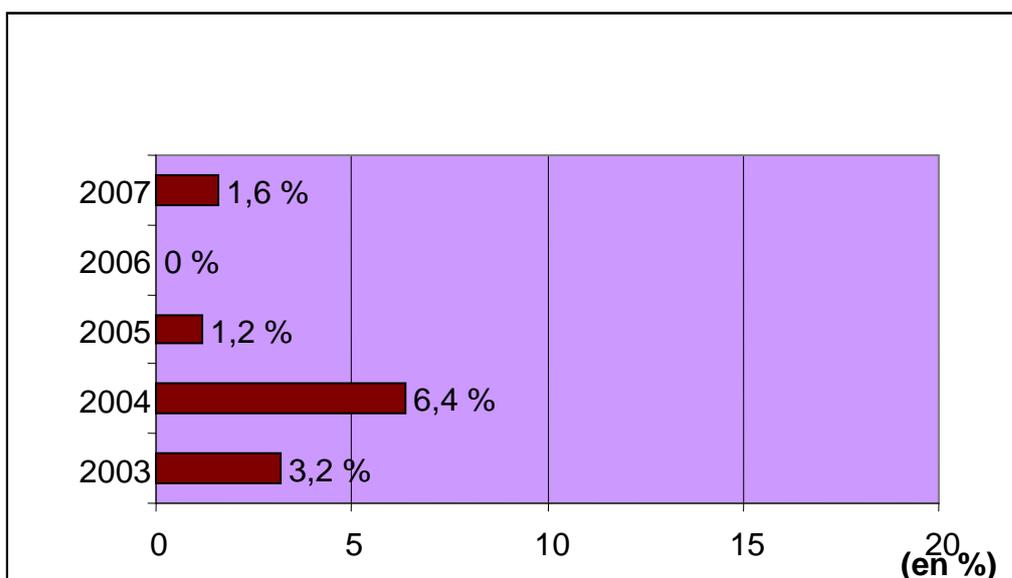


Figure 15 : Taux de prélèvements positifs à *Listeria*

Il convient de rappeler que le nombre d'analyses par an est de l'ordre de 250, ce qui conduit à des effectifs de produits contaminés très faibles.

A l'aide de ces deux figures, on s'aperçoit parfaitement que deux périodes se distinguent (FIGURE 14 et FIGURE 15) :

- Période 2003-2004

8 prélèvements en 2005 et 16 prélèvements en 2004 se sont révélés non-conformes. Ce qui représente respectivement 3,2 et 6,4% des analyses effectuées qui se sont révélées positives à *Listeria*.

- Période 2005-2007

3 prélèvements en 2005, 0 prélèvement en 2006 et 4 prélèvements en 2007 se sont révélés non-conformes. Ce qui représente seulement 1,2 ; 0 et 1.6% des analyses effectuées qui se sont révélées positives à *Listeria*.

Si on compare ces résultats généraux à l'enquête menée par la DGCCRF (DGCCRF, 2002), on peut remarquer la même tendance entre les deux.

Ainsi dans l'enquête de la DGCCRF, on remarquait une diminution des prélèvements contaminés, passant de 13% en 1993 à 5% en 2001.

Dans notre enquête, on voit que le taux de prélèvements positifs continue à descendre pour tendre vers une valeur proche de 1% (FIGURE 15).

Malheureusement, nous ne pouvons comparer les deux directement, l'enquête de la DGCCRF (TABLEAU 9) portant uniquement sur des prélèvements effectués sur des produits sensibles, et les prélèvements du LVAD portant sur les aliments sensibles et également l'environnement de production de ces produits.

Nous n'avons pas la proportion entre les prélèvements sur aliment et les prélèvements sur environnement pour les 250 prélèvements par an effectués par le LVAD. La seule indication donnée par le LVAD est que ce taux semble stable au fil des années.

	% d'échantillons contaminés								
	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Charc. Cuites (langues et têtes)	19	12	13	17	13	15	13	7	6
Charc.cuites (intestin et sang)	14	14	6	9	7	10	7	7	6
Rillettes	13	10	12	7	7	10	3	6	3
fromages pâte molle croûte fleurie crus	16	17	9	13	10	7	2	3	1
fromages pâte molle croûte lavée crus	12	11	9	8	5	4	7	5	5
Végétaux crus ensaucés réfrigérés	3	5	1	1	1	0	3	2	2
Salades composées	8	6	11	6	9	5	3	4	4
graines germées réfrigérés	16	22	5	0	0	12	3	6	6
Saurisserie	18	15	24	19	26	14	12	7	10
Coquillages vivants	-	-	4	2	4	7	4	4	3
total	13	11	10	8	9	8	6	5	5

TABLEAU 9 : Contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments à la distribution de 1997 à 2001 (DGCCRF, 2002)

3.2.2.1 *Listeria* dans les aliments

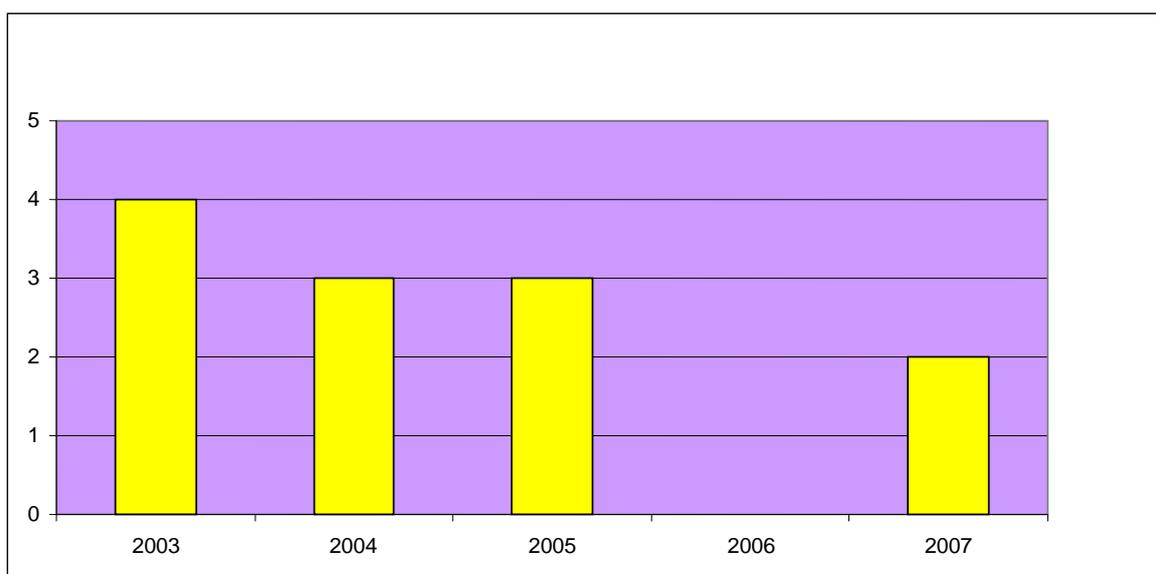


Figure 16 : Résultats positifs à *Listeria* dans les aliments sur la période 2003-2007 (LVAD 54)

Si on considère uniquement les prélèvements sur les denrées alimentaires, nous trouvons 4 résultats positifs en 2003, 3 en 2004 et en 2005, aucun en 2006, et 2 en 2007 (FIGURE 16).

Considérant que le nombre de prélèvements sur aliment est constant au fil des années, on peut voir que la proportion d'aliments contaminés diminue entre 2003 et 2007. Malheureusement, nous n'avons pas le nombre de prélèvements effectués uniquement sur aliment, ce qui nous empêche de comparer efficacement avec l'enquête de la DGCCRF. On peut cependant remarquer que la même tendance domine, c'est-à-dire une diminution du nombre d'aliments sensibles contaminés au fil des années.

3.2.2.2 *Listeria* dans l'environnement

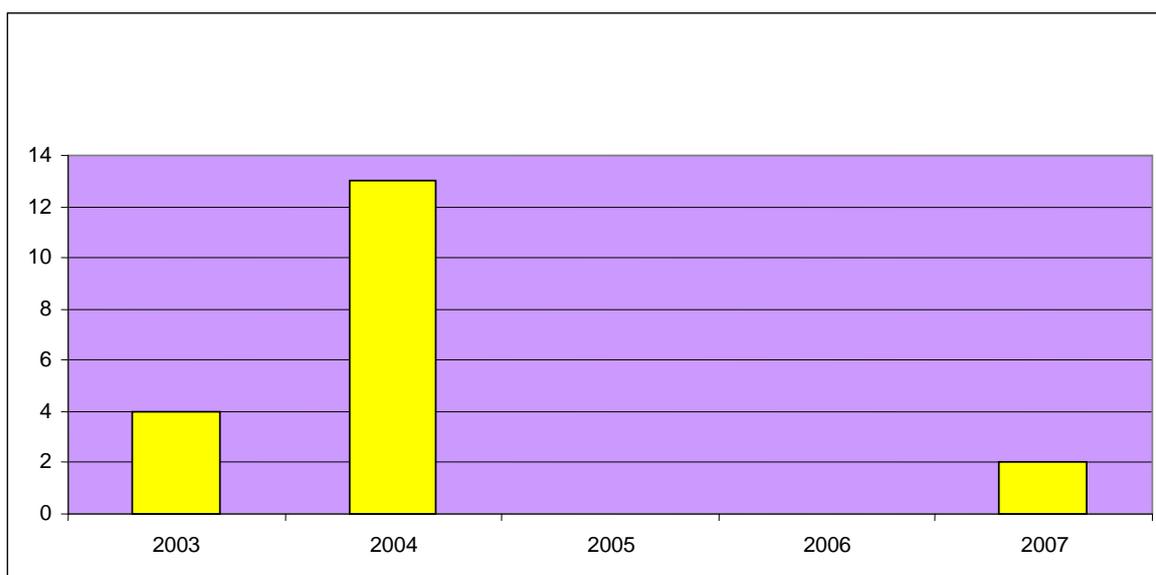


Figure 17 : Prélèvements positifs à *Listeria* dans l'environnement sur la période 2003-2007 (LVAD 54)

En 2003, 4 analyses sur l'environnement de fabrication des aliments se sont révélées positives à la présence de *Listeria* (FIGURE 17).

En 2004, le nombre d'échantillons positifs passe à 13.

Ensuite, en 2005 et 2006, aucun résultat positif n'est collecté à partir des prélèvements environnementaux.

En 2007, 2 prélèvements positifs sont à nouveau détectés.

Contrairement aux aliments, où la tendance à la baisse est régulière au fil des années, on peut voir que pour l'environnement, deux périodes distinctes sont mises en évidence.

- Avant 2004

On observe un taux élevé de positifs à *Listeria*, avec une explosion en 2004.

- A partir de 2005

Les résultats positifs ont quasiment disparu dans les prélèvements analysés, avec une légère réapparition en 2007.

L'amélioration notable de la non contamination des lieux de production/stockage par *Listeria monocytogenes* entre 2004 et 2005 peut s'expliquer par le développement à cette période de la prise de conscience des professionnels du secteur.

C'est à cette période que le paquet hygiène a été mis en place en Europe (Voir 3.4). Le paquet hygiène est un ensemble de textes réglementaires européens parus entre janvier 2002 et décembre 2005 qui constituent la réglementation concernant la production des aliments humains et animaux dans la communauté européenne.

De plus, les formations HACCP se sont de plus en plus répandues dans le secteur, visant à améliorer la qualité bactériologique et la salubrité des denrées alimentaires. (Voir 3.3).

Enfin pour compléter l'analyse de cette disparition de contamination environnementale entre 2004 et 2005, on peut mettre au crédit du LVAD un travail de terrain, de formation, d'explications aux professionnels, et de recherche avec eux des améliorations à apporter pour éviter la contamination de leurs lieux de production/stockages.

3.2.3 Sérotypes de *Listeria* trouvés

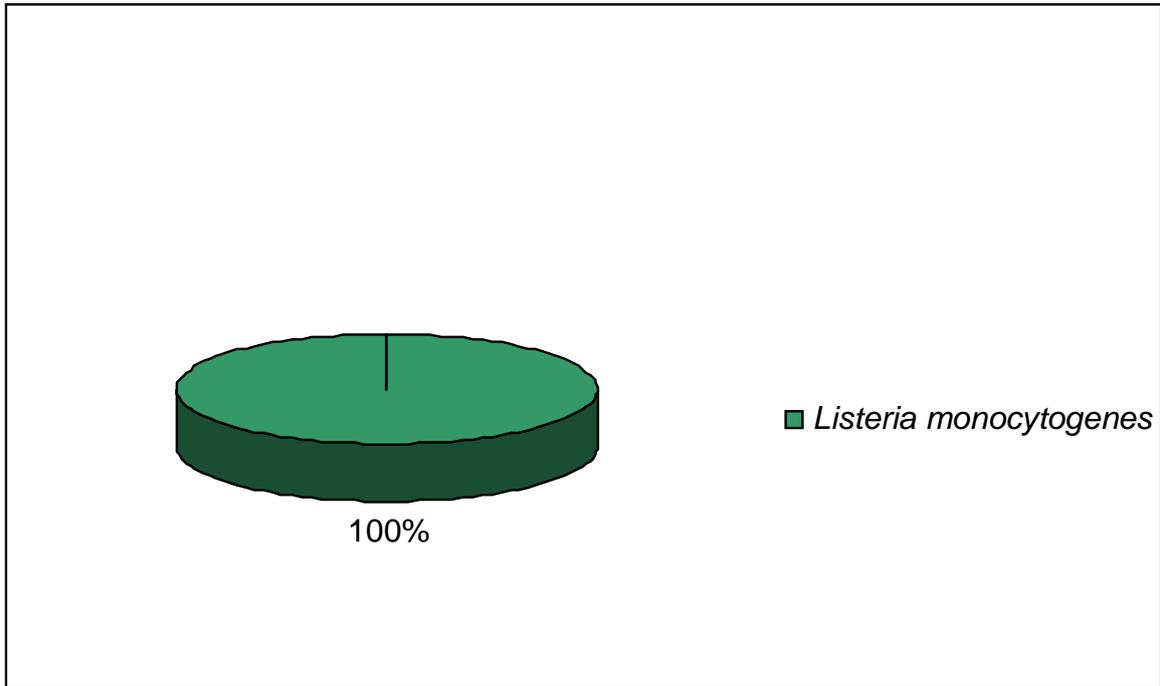


Figure 18 : Proportion de *L. monocytogenes* face aux autres sous espèces dans les aliments

Tous les aliments contaminés par *Listeria* l'étaient par *Listeria monocytogenes* à 100%. Pas d'autre sous espèce de *Listeria* mise en cause (FIGURE 18).

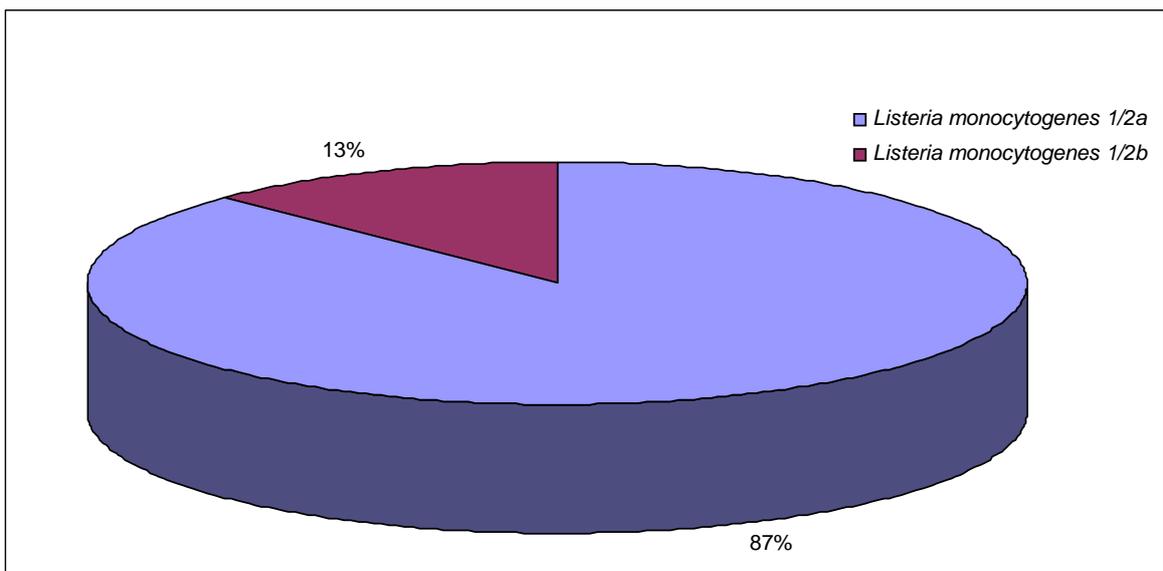


Figure 19 : Répartition des sérotypes significatifs de *L. monocytogenes* dans les aliments sur la période 2003-2007 (LVAD 54)

Parmi les sérotypes de *Listeria monocytogenes* mis en cause dans les aliments, 13% étaient du 1/2b et 87% du 1/2a (FIGURE 19).

Il est à remarquer que aucun sérotype 4b et 1/2c n'ont été trouvés.

Les résultats trouvés sont donc en concordance avec les résultats habituels trouvés en France, à savoir que 95% des isolats appartiennent aux serotypes 1/2a 1/2b ou 4b.

On peut également constater qu'à partir de 2005, le LVAD n'a plus demandé le sérotypage des *Listeria* pour les denrées alimentaires testées au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria*. En effet, l'identification réglementaire de *L. monocytogenes* ne nécessite pas le typage spécifique des isolats. Néanmoins, les schémas de typage peuvent être utiles pour les investigations lors d'épizooties, le suivi dans l'environnement et la surveillance en santé publique.

Il faut savoir également que Le CNR ne reçoit aucun produit biologique (sang, urines, organe, ...) ni alimentaire de quelque nature que ce soit. Seules les souches bactériennes en culture pure sont examinées. Les souches doivent impérativement être envoyées sur milieu gélosé, contenues dans des tubes à bouchage hermétique, pouvant résister aux chocs, et placés dans des emballages respectant la législation. Les souches de *Listeria* voyagent bien à la température ambiante et n'ont pas besoin d'être réfrigérées.

La fiche de renseignements fournie gratuitement par le CNR à tout laboratoire doit toujours accompagner chaque isolat et être remplie aussi complètement et aussi précisément que possible (ANNEXE 4)

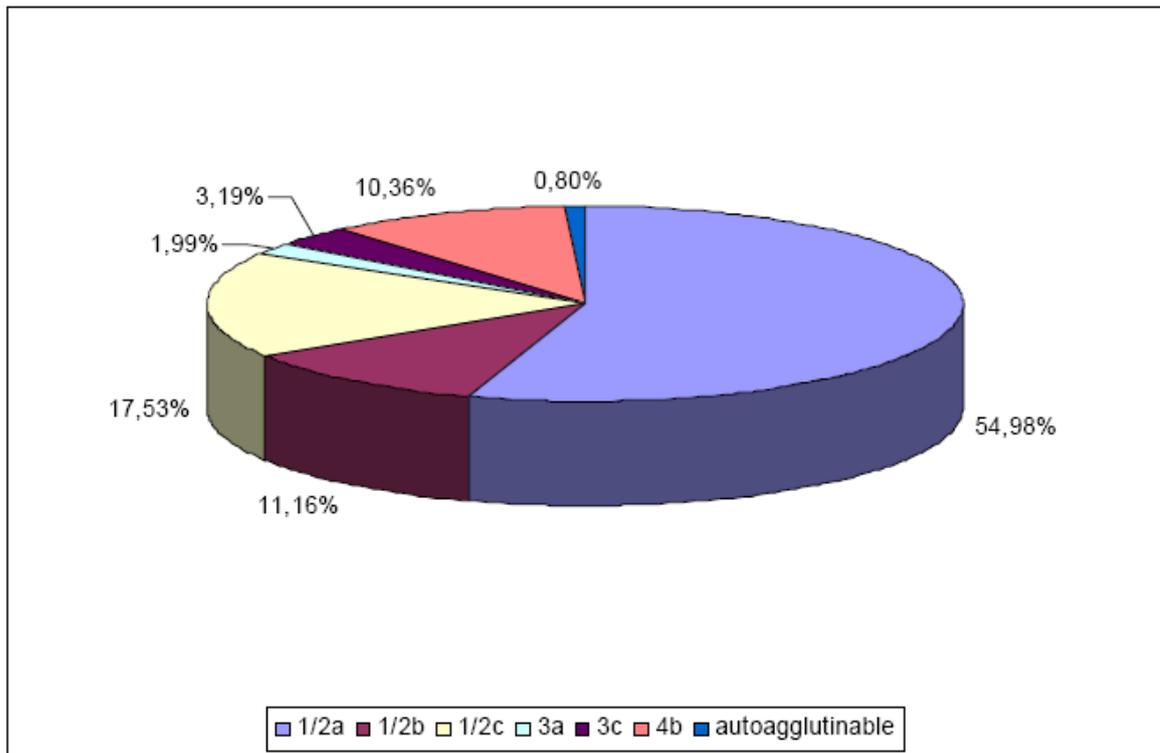


Figure 20 : Répartition des sérovars de *Listeria monocytogenes* en 2006 en Belgique (CENTRE DE REFERENCE DES *LISTERIA* BELGE, 2007)

Le CNR de nos voisins belges a constaté la répartition ci-dessus (Figure 20). Le sérovar le plus fréquent est comme celui observé au LVAD le 1/2a, mais ensuite, 1/2b 1/2c et 4b se retrouvent dans les mêmes proportions. La faible quantité de prélèvements positifs traités par le LVAD par rapport aux 318 échantillons positifs belges en 2006 expliquerait cette répartition non représentative des sérotypes du LVAD.

Dans le cas de l'environnement des lieux de production, la répartition des sérotypes des souches isolées par le LVAD est présentée sous forme de graphique (FIGURE 21). On peut remarquer qu'un des prélèvements positifs renfermait une souche de *Listeria innocua*. Cependant, la présence de *Listeria innocua* peut masquer la présence de *L.monocytogenes*, ce qui fait que la présence de *L.monocytogenes* n'est pas exclue dans ce prélèvement.

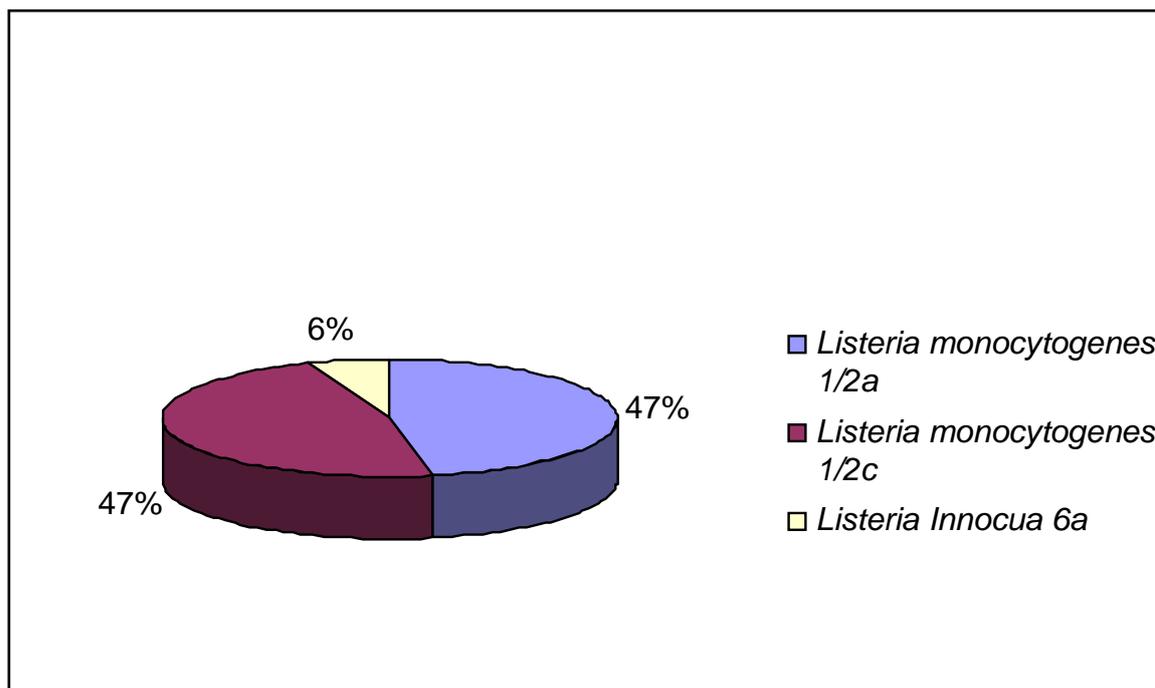


Figure 21 : Répartition des sérotypes de *Listeria* dans l'environnement pour la période 2003-2007 (LVAD 54)

Nous trouvons uniquement deux sérotypes différents de *L.monocytogenes* dans les prélèvements sur environnement, *L.monocytogenes* 1/2a et *L.monocytogenes* 1/2c, tous deux représentant 47%.

3.2.4 *Listeria monocytogenes* d'origine alimentaire. Répartition en fonction des aliments

L'analyse des matrices échantillonnées a permis de classer les prélèvements en catégories d'aliments (TABLEAU 10).

Matrice	2003	2004	2005	2006	2007	Total
Viande	2	2			2	6
Poisson fumé	2		1			3
Fruit surgelé		1	1			2
Fromage au lait crû			1			1
Total	4	3	3	0	2	

Tableau 10 : Catégories d'aliments contaminés par *L. monocytogenes* sur la période 2003-2007 (LVAD 54)

En cinq ans, seulement quatre matrices différentes ont été identifiées (FIGURE 22).

A six reprises, la matrice incriminée était une viande.

Pour trois des résultats positifs, il s'agissait d'un poisson fumé.

Deux prélèvements positifs avaient pour matrice des fruits surgelés.

Enfin, *L. monocytogenes* n'était présent que dans un seul fromage au lait cru.

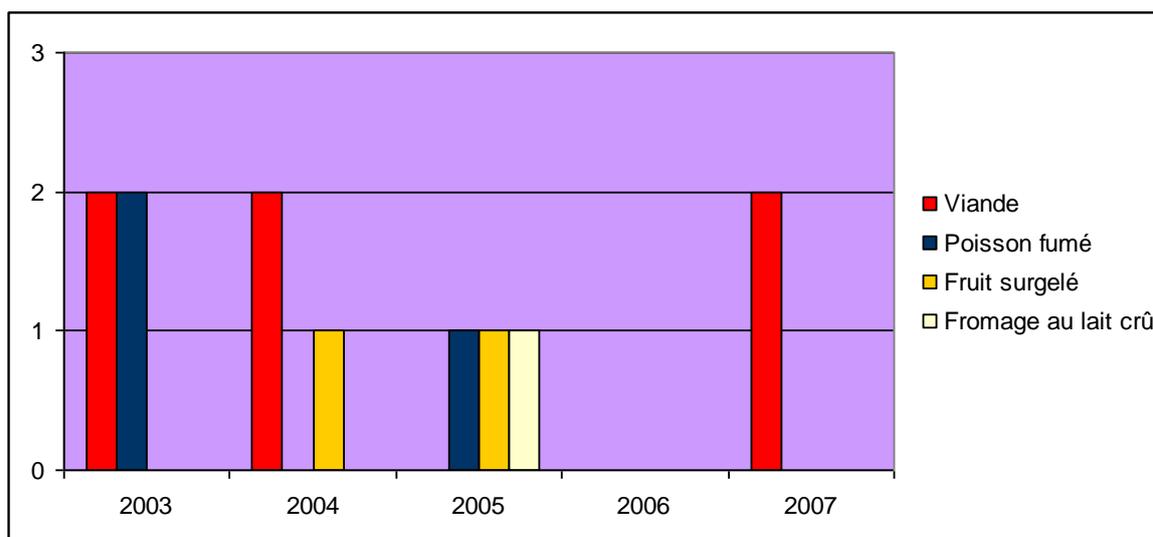


Figure 22 : Répartition des matrices alimentaires pour les résultats positifs à *L. monocytogenes* sur la période 2003-2007 (LVAD 54)

Les produits les plus sensibles à une contamination sont ceux qui peuvent favoriser la croissance des *Listeria*, qui ont une durée de vie longue et qui peuvent être consommés sans être chauffés (produits laitiers, charcuterie, et produits de la pêche). Environ 5% des aliments sensibles sont contaminés à la distribution (enquête DGCCRF).

En ce qui concerne notre enquête, toutes nos matrices positives étaient potentiellement dangereuses, mise à part les produits carnés comme les saucisses, qui sont en général cuites à cœur. La contamination peut être de surface (*Listeria* est ubiquitaire) due à un contact, ou plus en profondeur, comme pour les viandes reconstituées comme les saucisses ou les viandes hachées.

Pour le reste, les fruits décongelés, le fromage, ou le poisson fumé sont en général consommés sans cuisson, et donc sans destruction de la bactérie. Ces produits méritent donc une plus ample vigilance vis-à-vis du consommateur.

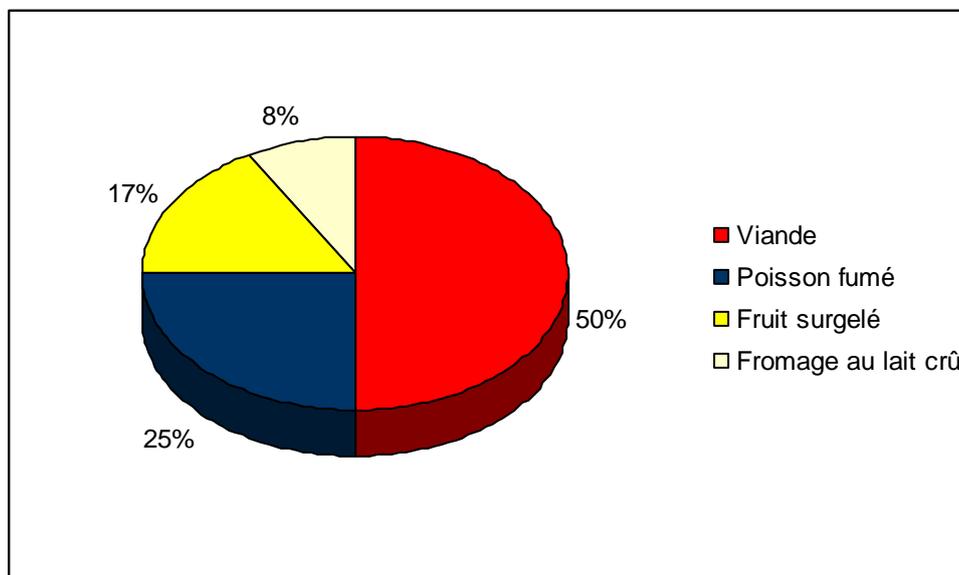


Figure 23 : Les aliments contaminés par *L. monocytogenes* mis en évidence au LVAD de 2003 à 2007

50% des produits contaminés étaient des viandes (FIGURE 23).

25% des prélèvements positifs l'étaient pour du poisson fumé.

17% des échantillons ayant révélés la présence de *L. monocytogenes* étaient des fruits surgelés.

8% des analyses positives ont pour provenance du fromage au lait crû.

Ces résultats sont plutôt concordant quand aux matrices contaminées habituellement, par contre il nous est impossible de comparer les proportions par manque de données pour notre étude.

Enfin, il est à noter qu'habituellement, ce sont plutôt des produits de type charcuterie qui sont contaminés, mais dans notre étude, les matrices à base de viande rentrent très peu dans cette catégorie.

3.3 Qu'est ce que le HACCP

3.3.1 Définition

L' HACCP, de l'anglais « Hazard Analysis Critical Control Point », qu'on peut traduire par Analyse des dangers – points critiques pour leur maîtrise, est une méthode, un outil de travail, mais n'est pas une norme.

D'origine américaine, l'HACCP est né dans les années 60 lorsque la NASA décida d'envoyer des hommes dans l'espace. Il fallait alors pouvoir garantir la sécurité des aliments des astronautes sans pour autant détruire les produits pour les analyser. Le gouvernement des Etats-Unis a alors demandé à une société privée, Pillsbury, de concevoir un outil permettant d'assurer une sécurité alimentaire. Cet outil fut la première ébauche de la méthode HACCP, créée ensuite par Bauman.

L'HACCP est donc un outil de gestion, qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments.

La méthode repose sur l'identification de 3 classes de dangers en hygiène alimentaire.

- Les dangers biologiques (bactéries, virus..)
- Les dangers chimiques (pesticides, additifs..)
- Les dangers physiques (bois, verre...)

Notre étude sur *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* entre donc dans l'identification des dangers biologiques liés à ces deux bactéries.

3.3.2 Les 7 principes de l'HACCP

Principe 1 : Procéder à une analyse des risques

Tous les dangers éventuels des différentes phases de production alimentaire, de la culture de base jusqu'au produit transformé final, doivent être listés.

Principe 2 : Déterminer les points critiques pour la maîtrise : Les CCP

La détermination repose sur un arbre décisionnel.

Principe 3 : Fixer le ou les seuil(s) critique(s)

Parmi les critères les plus fréquemment utilisés, on peut citer les mesures de température, de temps, de pH, le contrôle visuel, l'humidité.

Principe 4 : Mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP.

Des tests et des observations doivent être programmés. Les mesures chimiques et physiques sont en général préférées aux mesures microbiologiques pour une question de rapidité de résultat.

Principe 5 : Déterminer les mesures correctives à prendre lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est pas maîtrisé.

Cela permet de réagir immédiatement dès qu'un paramètre critique est dépassé, ces écarts doivent être reportés dans les dossiers HACCP.

Principe 6 : Appliquer des procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement.

Pour ce faire, on pratique des échantillonnages et des analyses au hasard dans la chaîne de production.

Principe 7 : Constituer un dossier dans lequel figureront toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application.

Le dossier doit contenir les enregistrements des ingrédients, la transformation, la nature des conditionnements et du stockage, ainsi que tous les écarts de CCP relevés.

3.3.3 Les 12 étapes de l'HACCP

1 Constituer l'équipe HACCP

En général l'équipe sera pluridisciplinaire. Si des spécialistes ne sont pas disponibles dans l'entreprise, il faudra faire appel à des experts extérieurs. Il existe des guides HACCP propres à chaque produit. Ainsi un individu ayant la formation adéquate et en possession de ces guides pourra mettre en œuvre le système HACCP dans l'entreprise.

2 Décrire le produit

Une description complète du produit est nécessaire. Ainsi la composition, la structure physique et chimique, les traitements microbiocides et microbiostatiques (congélation, cuisson, saumure..) le conditionnement, les conditions de stockage et de distribution doivent être détaillés.

3 Déterminer son utilisation prévue

Il faut prendre en compte l'utilisation du produit, ou le consommateur final. Il faudra faire très attention aux groupes de population sensible, telle la restauration collective par exemple.

4 Etablir un diagramme des opérations

Ce diagramme comprendra toutes les étapes opérationnelles pour un produit donné.

5 Confirmer sur place le diagramme des opérations

Comparer en permanence le déroulement des opérations de transformation au diagramme des opérations prévu et, le cas échéant, modifier ce dernier.

6 Enumérer tous les dangers potentiels associés à chacune des étapes, effectuer une analyse des risques et définir les mesures permettant de maîtriser les dangers ainsi identifiés

Il faudra analyser tous les dangers pouvant intervenir à tous les stades de production. Tous les risques devront être analysés, et ceux qui sont potentiellement dangereux doivent être neutralisés, ou ramenés à un niveau tel qu'ils ne présentent plus de menace, afin d'obtenir des aliments sains.

On peut utiliser la méthode des 5M, dite méthode d'Ishikawa (FIGURE 24), pour faire la liste des dangers chimiques, physiques ou biologiques.

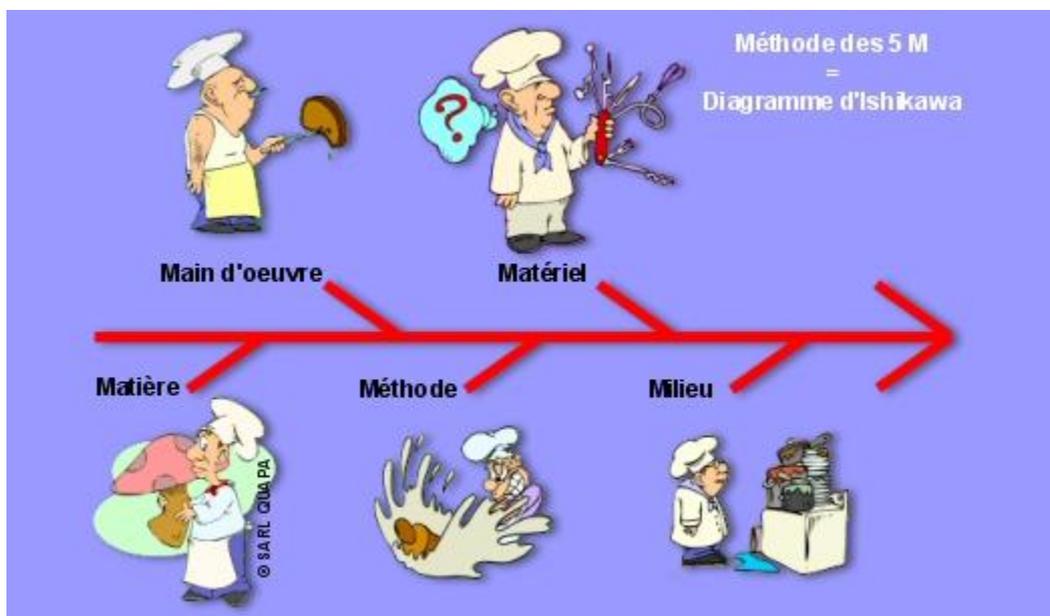


Figure n° 24 : Méthode des 5M pour lister les dangers (SARL QUAPA, 2008)

Les critères suivants seront pris en compte dans l'évaluation des risques :

- probabilité qu'un danger survienne et gravité de ses conséquences sur la santé
- évaluation qualitative et/ou quantitative de la présence des dangers
- survie ou prolifération des micro-organismes dangereux
- apparition ou persistance dans les aliments de toxines, de substances chimiques ou d'agents physiques

7 Déterminer les points critiques pour la maîtrise

Il faudra utiliser un arbre de décision (FIGURE 25).

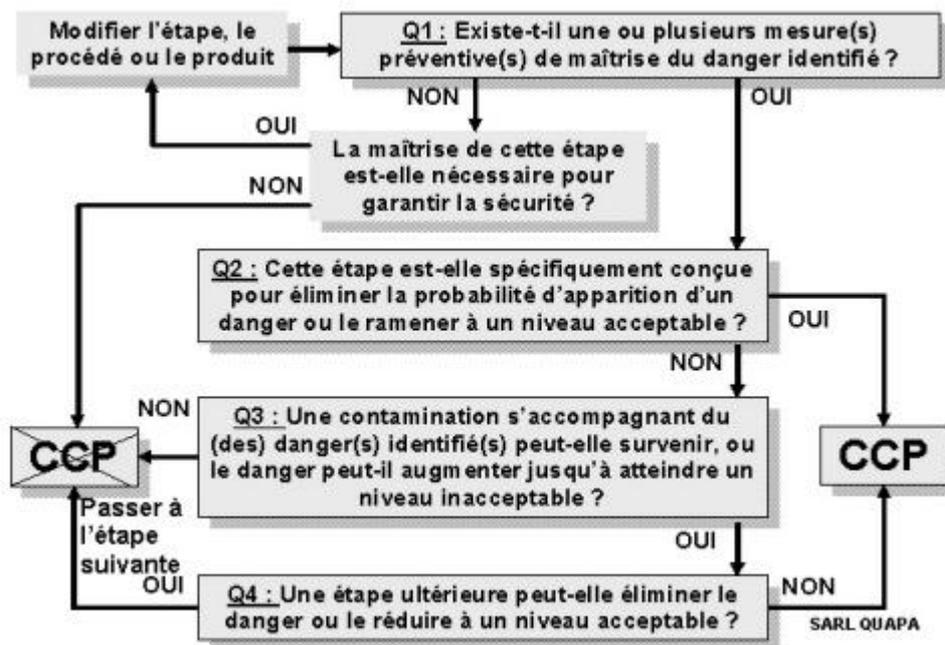


Figure n°25 : Arbre de décision pour déterminer si l'étape est un CCP (SARL QUAPA, 2008)

Si un danger a été identifié à une étape où un contrôle de sécurité est nécessaire et qu'aucune mesure de maîtrise n'existe au niveau de cette étape ou de toute autre, il faudrait alors modifier le produit ou le procédé correspondant à cette étape, ou à un stade antérieur ou ultérieur, de manière à prévoir une mesure de maîtrise.

8 Fixer des seuils critiques pour chaque CCP

Les seuils doivent être mesurables, comme la contamination bactérienne, la température etc..

Le seuil n'est bien sûr valable que pour l'étape en question (contamination bactérienne absente après cuisson par exemple, mais pouvant être présente au départ).

9 Mettre en place un système de surveillance pour chaque CCP

Pour la température, un relevé journalier reporté sur document par exemple.

Il convient de réagir rapidement, afin de rectifier le tir si des seuils critiques tendent à être atteints.

10 Prendre des mesures correctives

Elles doivent être prévues dans le cadre du système HACCP pour chaque CCP afin de rectifier les éventuels écarts. Le sort des produits en question doit aussi être prévu.

11 Instaurer des procédures de vérification

Mise en place du contrôle des produits finis, d'audits planifiés, avec bien sûr un étalonnage des appareils de contrôle.

12 Constituer des dossiers et tenir des registres

Toutes les procédures doivent être retranscrites sur papier et consultables, afin de donner un sentiment de contrôle à l'entreprise. Les dossiers peuvent être par exemple l'analyse des dangers, la détermination du CCP, détermination du seuil critique. On doit tenir des registres les activités de surveillance des CCP, les écarts et mesures correctives associées, l'exécution des procédures de vérification, les modifications apportées au plan HACCP.

3.4 La paquet Hygiène

3.4.1 Définition

Le paquet hygiène est un ensemble de textes réglementaires européens parus entre janvier 2002 et décembre 2005 qui constituent la réglementation concernant la production des aliments humains et animaux dans la communauté européenne.

Les principaux textes sont des règlements d'application obligatoire dans tous les états membres, sans transcription en droit national.

La parution du paquet hygiène a entraîné l'abrogation des anciennes réglementations européennes, et des arrêtés nationaux transcrivant les anciennes directives.

3.4.2 Un ensemble de textes

Le paquet hygiène est composé des textes suivants :

Règlement 178/2002 dit « Food Law »

Etablit les principes généraux et instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant les procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.

Règlement 852/2004 dit « H1 »

Relatif à l'hygiène des denrées alimentaires.

Règlement 853/2004 dit « H2 »

Fixe les règles spécifiques d'hygiène applicable aux denrées alimentaires d'origine animale.

Règlement 854/2004 dit « H3 »

Fixe les règles spécifiques d'organisation de contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Directive 2002/99 dite « H4 »

Fixe les règles de police sanitaire régissant la production, la transformation, la distribution et l'introduction des produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Règlement 882/2004

Relatif aux contrôles effectués et à la législation sur les aliments pour animaux, à la santé et au bien-être animal.

Directive 2004/41

Abrogeant certaines directives relatives à l'hygiène des denrées alimentaires.

Règlement 183/2005

Etablit des exigences en matière d'hygiène des aliments pour animaux.

Règlement 2073/2005

Concerne les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.

Règlement 2074/2005

Vise à établir des champs d'application et l'organisation des contrôles officiels.

Règlement 2075/2005

Concerne la présence de Trichinella dans les viandes

La réglementation peut sembler compliquée, mais elle se résume très bien sur la figure 26.

Le domaine du paquet hygiène qui va nous intéresser est le 2073/2005 qui contient les critères microbiologiques relatifs aux aliments de détail.

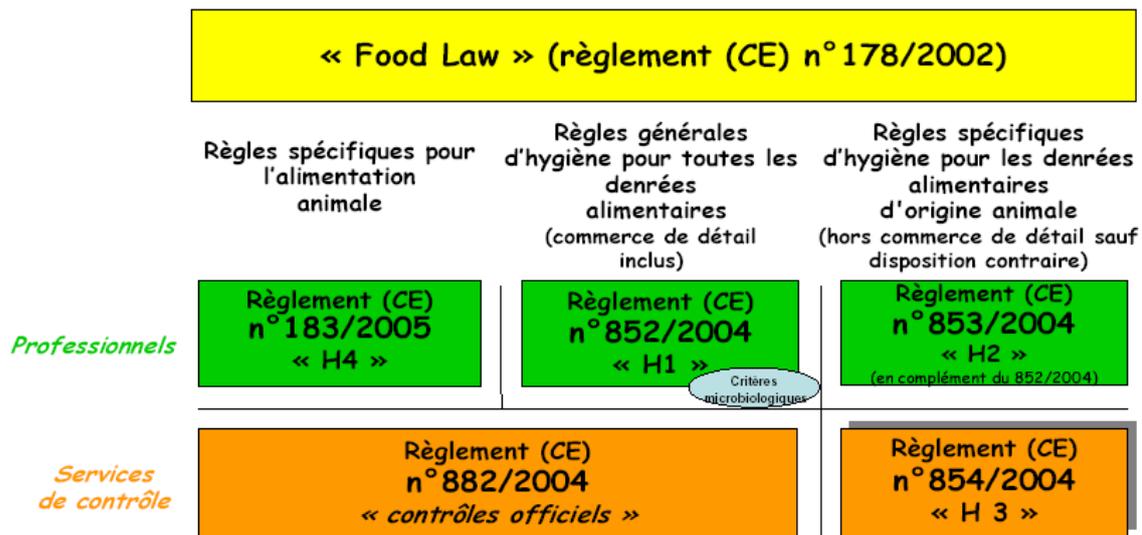


Figure n° 26 : Architecture du paquet hygiène (DOP, 2006)

3.4.3 Les objectifs

Le paquet hygiène induit une obligation de résultat quant à la salubrité de la denrée alimentaire afin d'assurer la protection de la santé du consommateur.

Aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse ; est dit dangereuse si elle est préjudiciable à la santé ou si elle est impropre à la consommation humaine.

Tout cela se base sur l'analyse du risque, via la méthode HACCP. La loi va même plus loin en renforçant la traçabilité des produits, et la possibilité d'effectuer des retraits rappels des denrées.

Le système d'alerte demeure le RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).

3.4.4 Les moyens

Les professionnels de l'alimentaire ont l'obligation de pratiquer une analyse du risque sur leurs plateformes.

Les méthodes d'inspections sont désormais normalisées entre les ministères, avec un plan au niveau national, avec des rapports eux aussi normalisés. Les risques sont désormais appréhendés par danger plutôt que par filière.

Les professionnels doivent pratiquer des audits internes dans le cadre d'une démarche qualité, et des audits externes.

Le règlement 2073/2005 met en œuvre des autocontrôles des exploitants, c'est le cas des prélèvements effectués par le LVAD.

Ces autocontrôles sont au choix du demandeur, ils ne sont pas rendus publics, et leur nombre et leur fréquence doit être en adéquation avec le plan HACCP de l'entreprise.

Les services de contrôle réglementaires vérifient quant à eux que le plan HACCP est bien appliqué.

Tout ceci a pour but une diminution des contrôles officiels avec prélèvements, qu'on appellera au cas par cas, avec une responsabilisation des professionnels à s'autogérer. L'inspection est désormais plus axée sur le respect des bonnes pratiques, la conformité des locaux et des procès, et sur le respect et la cohérence du dossier HACCP de l'entreprise.

On pourra donc résumer ces textes de lois par « Moins de moyens officiels mobilisés par une plus grande responsabilisation des professionnels, pour plus de résultats et une plus grande sécurité pour le consommateur » .

CONCLUSION

Conclusion

La sécurité alimentaire est à considérer dans sa globalité. Les résultats de contamination à *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* mis en évidence par le LVAD sont encourageants, avec un très petit nombre de denrées alimentaires contaminées. Le risque industriel semble maîtrisé, même si le risque zéro n'existe et n'existera sans doute jamais en production agro-alimentaire.

La région de Nancy semble donc être un bon élève quant à l'application des directives européennes de lutte contre le risque microbiologique.

Il est à regretter que les données mises à disposition par le LVAD pour l'étude ne soient pas plus complètes, ce qui aurait permis de mettre en évidence des types d'aliments plus contaminés que d'autres, et la proportion de chaque type d'aliment contaminé.

Cependant, nous devons rester d'une extrême vigilance quant à la sécurité des denrées alimentaires, car on voit bien que la moindre erreur se paie chère, et que la recherche de mise sur le marché de produits d'une extrême fraîcheur fait que le temps entre les analyses et la mise en vente peut être extrêmement court, voir trop court pour empêcher le retrait de lots contaminés. De plus, la notion d'autocontrôle sur des lots aléatoire peut permettre à des lots contaminés de passer à travers les mailles du filet.

Enfin, la lutte pour la salubrité des aliments doit se poursuivre jusque chez le consommateur, car les industriels sous la pression des pouvoirs publics auront beau mettre sur le marché des produits irréprochables, sans une vigilance accrue de chacun quant au transport, à la conservation, et au bon usage de ses achats alimentaires, le risque existera toujours.

Une plus grande éducation du grand public nous semble indispensable, et devrait recevoir plus de crédits de la part de l'union européenne. Des programmes privés sponsorisés par des industriels existent, mais l'éducation alimentaire reste malheureusement trop souvent absente des programmes scolaires et des formations dispensées aux futurs enseignants dans les IUFM. C'est pourquoi la prochaine grande étape d'amélioration de la salubrité des aliments devrait être à notre avis l'éducation du grand public, tout en continuant la surveillance des professionnels.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

AFSSA, 2003. *Classification des aliments du point de vue du risque lié à la présence de L. monocytogenes*. Saisine n° 2003-SA-0362. AFSSA. p9-10.

AMGAR A., BENEMBAREK P., BUCHANAN R. CAHILL S., CERF O., DOYLE M., FARBER J., GOULET V., LAMMERDING A., MARTIN P., MEYER-BROSETA S., NOMING B., PIERRE O., ROSSO L., ROCOURT J., SWAMINATHAN B., TENAILLEAU S., 2004. *Analyse des risques et Listeria monocytogenes*. 5ème Conférence Internationale ASEPT, 17-18 mars 2004. Laval. France.

AVRIL J.L., 2000. *Bactériologie clinique*. Troisième édition. Ellipse. p140-150.

BELLOUNI R., 1990. *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en médecine. DESM, INESSM. Alger. p1-165.

BERCHE P., 1999. *Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à Listeria monocytogenes*. Infections néonatales II. Vol2, n° 1. p33-39.

BIND J. L., 1990. *Analyse critique des méthodes de recherche, de dénombrement et d'identification des Listeria en industries agro-alimentaires*. Compte-rendu des conférences prononcées à l'occasion du séminaire CPCIA d'octobre 1990. APRIA. Paris. p55-76.

BORNERT G., *Le poulet sans salmonelles : Mythe ou réalité?*. Revue Méd. Vét. 151(12). p1083-1094.

BROOME C.V., GELLIN B., SCHWARTZ B., 1990. *Epidemiology of listeriosis in the United States*. Foodborn Listeriosis. AJ Miller, JL Smith and GA Somkuti eds. NY : Elsevier Science Pub. p61-65.

BROUARD C. et Al., 2006. *Épidémie de salmonellose à Salmonella enterica sérotype Agona liée à la consommation de poudres de lait infantile, France, janvier-mai 2005*. BEH n° 33/2006 : 248-250.

BUCHANAN R., LINDQVIST R., ROSS T., SMITH M., TODD E., WHITING R., 2004. *Évaluation des risques liés à Listeria monocytogenes dans les aliments prêts à consommer*. Rapport de la FAO. Rome 2004. p1-51.

CENTRE DE REFERENCE DES LISTERIA BELGE, 2007. *Rapport annuel – Souches de Listeria isolées en Belgique en 2006*. http://www.iph.fgov.be/Bacterio/iframes/rapports/2006/Listeria_2006_FR_web.pdf. Consultable en ligne le 27/04/08.

CODEX sur l'hygiène alimentaire. 2004. Rapport de la trente sixième session du comité du CODEX sur l'hygiène alimentaire. Washington. USA. 29 mars au 03 avril 2004. p1-39.

CODEX sur l'hygiène alimentaire. 2005. Rapport de la trente septième session du comité du CODEX sur l'hygiène alimentaire. Buenos-Aires. Argentine. 14 au 19 mars 2005. p1-127.

CURIALE M.S., LEWUS C., 1994. *Detection of Listeria monocytogenes in samples containing Listeria innocua*. Journal of food protection. N° 57. p1048-1051.

DGCCRF, 2002. *La surveillance de la contamination par Listeria monocytogenes des aliments à la distribution de 1997 à 2001*. http://www.finances.gouv.fr/fonds_documentaire/dgccrf/04_dossiers/consommation/contrôles_alimentaires/actions/listeria0802.htm. Consultable en ligne le 27/04/08.

DOP J.P., 2006. *Le paquet hygiène et le règlement (CE) n°2073/2005 « critères microbiologiques »*. Journées de l'ADILV, compte rendu, Pau du 26 au 27 octobre 2006.

DUMAS J., 1958. *Tribu des Salmonellae*. Bactériologie médicale. Flammarion. p399-433.

ENCARTA Encyclopédie 2004 [CDRom]. Salmonelles. Microsoft.

EUZÉBY J.P., 2006. *Abrégé de bactériologie générale et médicale à l'usage des étudiants de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse*. Masson.

FAO / OMS. 2002. *Forum mondial FAO OMS des responsables de la sécurité sanitaire des aliments. Améliorer l'efficacité et la transparence dans les systèmes de sécurité sanitaire des aliments. Partager l'expérience*. Marrakech. Maroc. 28 au 30 janvier 2002. p1-223.

FRENEY J. et RENAUD F., 2007. *Précis de bactériologie clinique*. Ed. Eska. p1051-1073.

GELLIN B.G. et BROOME C.V., 1989. *Listeriosis*. Journal of the American Medical Association, 261. p1313-1320.

GELLIN B.G., BROOME C.V., BIBB W.F., WEAVER R.E., GAVENTA S., et MASCOLA L., 1991. *The epidemiology of listeriosis in the United States--1986*. Listeriosis Study Group. American Journal of Epidemiology. 133. p392-401.

GLEDEL J., CORBION B., 1991. *Le genre Salmonella dans le contrôle microbiologique*. 2^{ème} édition. p480.

GRIMONT P., WEIL F.X., 2007. *Rapport d'activité 2006*. Centre national de référence des Salmonella. Institut Pasteur. Paris. 2007. p1-51.

HAEGHEBAERT S. et Al., 2002. *Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 2001*. BEH n°50/2002. p249-252.

HUMBERT F., SAUTRA L., FEDERIGHI M., JOUVE J.L., 1998. *Manuel de bactériologie alimentaire*. p27-52.

JACQUET CH. et Al., 1998. *La listériose humaine en France en 1997*. BEH n° 33/1998. p5-9.

LARPENT J.P., 2000. *Listeria*. 2nd édition. Tec & Doc. Paris.

LE MINOR L. et POPOFF M.Y.; 1987. *Request for an Opinion. Designation of Salmonella enterica sp. nov. nom. rev., as the type and only species of the genus Salmonella*. Int. J. Syst. Bacteriol. p465-468.

LE MINOR et POPOFF : *Formules antigéniques des sérovars de Salmonella*, 7eme révision, Institut Pasteur, Paris, France, 1997.

RAPIDMICROBIOLOGY, 2008. *Visuel du test Rapid'L mono*. <http://www.rapidmicrobiology.com/news/1027h5p.JPG>. Consultable en ligne le 27/04/08.

REEVES M.W., EVINS G.M., HEIBA A.A., PLIKAYTIS B.D., FARMER J.J.. *Clonal nature of Salmonella typhi and its genetic relatedness to other Salmonella as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of Salmonella bongori comb*, J. Clin. Microbiol. p313.

Règlement (CE) N°2073/2005 du 15 novembre 2005, concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JO de l'Union Européenne. 15 Novembre 2005. L338. p1-26.

ROBERTS D., 1989. *Listeria monocytogenes in foods – results of two PHLS [Public Health Laboratory Service] surveys*. Journal of applied Bacteriology n° 67. London.

ROBERTS T., PINNER R., 1990. *Economic impact of disease caused by L. monocytogenes*. Miller, Smith & Somkuti Eds. p137-149.

ROBIN S., ROCHE S., 2005. *Cours de bactériologie – Listeria monocytogenes*. Université Claude Bernard Lyon 1.

ROCOURT J., 1996. *Taxonomie du genre Listeria et typage de Listeria monocytogenes*. Pathologie biologique. Vol44, n° 9. p749-756.

ROCOURT J. et Al., 1997. *La listériose en France en 1995 et 1996. Données du Centre national de référence des Listeria*. BEH n° 41/1997. p3-8.

ROCOURT J., 2000. *Rapport d'activités du centre national de référence des Listeria*. Institut Pasteur. Paris.

SARL QUAPA, 2008. *La méthode HACCP*. http://www.quapa.com/methode_haccp.htm. Consultable en ligne le 27/04/08.

SCHUCHAT A., PINNER R.W., DEEVER K., SWAMINATHAN B., WEAVER R., HAYES P.S., REEVES M., PIERCE P., WENGER J.D., BROMME C.V., 1991. *Epidemiology of listeriosis in the USA. Compte-rendus de la conference internationale. Listeria et sécurité alimentaire*. Amgar Ed. Juin 1991. Laval. p69-73.

SCHLECH W.F., 1996. *Virulence characteristics of Listeria monocytogenes*. Food Tech 42. p176-178.

SEELIGER H.P.R et JONES D., 1986. Genus Listeria. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore. Williams & Wilkins. p1235-1245.

TEMPLE M. E., NAHATA M. C., 2000. *Treatment of listeriosis*. The Annals of pharmacotherapy. Whitney, Cincinnati, Etats Unis. 2000. Vol. 34 n°5. p656-661.

ANNEXES

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de culture

Le bouillon RAPPAPORT VASSILIADIS

AGENTS NUTRITIFS : - Peptone de farine de soja : 4,5 g/l

- Chlorure de sodium : 8,0 g/l

- Hydrogénophosphate dipotassique : 0,4 g/l

- Dihydrogénophosphate de potassium : 0,6 g/l

- Eau : 1000 ml

AGENTS SELECTIFS : - Chlorure de magnésium hexahydraté : 29,0 g/l

- Vert malachite : 0,036 g/l

pH = 5,2 ±0,2

On peut ajouter de la novobiocine (40mg/l) pour inhiber la flore d'accompagnement. Les concentrations ajustées en vert malachite et chlorure de magnésium permettent la croissance des Salmonelles à 43°C. L'addition de peptone de farine de soja a le même but. L'abaissement du pH à 5,2 améliore la sélectivité.

Bouillon SELENITE CYSTINE

AGENTS NUTRITIFS :

- Peptone de caséine : 5,0 g/l

- L (-)-cystine: 0,01 g/l

- Lactose : 4,0 g/l

- Phosphate de sodium : 10,0 g/l

- Eau : 1000 ml

AGENTS INHIBITEURS :

- Sélénite de sodium : 4,0 g/l

pH : 7,0 ±0,2

Le sélénite présent dans le milieu inhibe la croissance des bactéries coliformes et des entérocoques dans les 6 à 12 heures suivant le début de l'incubation ; ensuite,

l'action inhibitrice diminue lentement. Les *salmonella*, *Shigella*, *Proteus* et *Pseudomonas* ne sont que légèrement inhibés.

Gélose d'Edel-Kampelmacher

AGENTS NUTRITIFS :

- Peptone de viande : 10,0 g/l
- Extraits de viande : 5,0 g/l
- Extraits de levure : 3,0 g/l
- Lactose : 10,0 g/l
- Saccharose : 10,0 g/l
- Chlorure de sodium : 3,0 g/l
- Hydrogénophosphate disodique : 1,0 g/l
- Dihydrogénophosphate de sodium : 0,6 g/l
- Agar-agar : 12,0 g/l

AGENTS INHIBITEURS : - Vert brillant : 0,0047 g/l

INDICATEUR COLORE : - Rouge de phénol : 0,09 g/l

pH : 6,9 ±0,2

Le milieu contient du lactose dont la dégradation en acide est mise en évidence par l'indicateur de pH, le rouge de phénol. L'agar est basé sur le même principe que l'agar BPL selon KAUFFMAN; la croissance des Salmonelles est cependant améliorée par une base plus riche, la croissance de la flore secondaire est supprimée par une augmentation du vert brillant. Les Salmonelles ne peuvent fermenter ni le saccharose, ni le lactose, ces sucres présents dans le milieu permettent l'identification des micro-organismes faiblement lactose - positifs ou négatifs, et saccharose - positifs.

Milieu de Rambach

AGENTS NUTRITIFS :

- Peptone : 8,0 g/L
- Sodium chlorure : 5,0 g/L
- Mélange chromogène : 1,5 g/L

- Propylène glycol : 10,5 g/L

- Agar agar : 15,0 g/L

AGENT SELECTIF :

-Sodium désoxycholate : 1,0 g/L

pH du milieu prêt à l'emploi à 25 °C : $7,3 \pm 0,2$

Le milieu permet une croissance rapide des entérobactéries, et le désoxycholate de sodium inhibe la flore gram +. Le propylène glycol métabolisé par Salmonella va donner une couleur rouge caractéristique sur le milieu de culture.

Bouillon d'enrichissement de Fraser-demi - Composition pour 1 litre

NaCl : 20,0 g

Na₂HPO₄ : 12,0 g

Extraits de viande de bœuf : 5,0 g

Protéose peptone : 5,0 g

Digestion pancréatique de caséine : 5,0 g

Extraits de levure : 5,0 g

LiCl : 3,0 g

KH₂PO₄ : 1,35 g

Esculine : 1,0 g

Acriflavine (12,5 mg de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

Acide nalidixique (20 mg d'acide nalidixique dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

Citrate de fer ammoniacal (500 mg de citrate de fer ammoniacal dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

pH : $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C

Composition identique au bouillon d'enrichissement de Fraser mais la solution d'acriflavine est composée de 12,5 mg de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 mL d'eau distillée.

Gélose d'Oxford

Peptone : 23,0 g

LiCl : 15,0 g

Agar : 10,0 g

Amidon de maïs : 1,0 g
Esculine : 1,0 g
Citrate de fer ammoniacal : 0,5 g
Solution d'antibiotiques : 10,0 mL

Solution d'antibiotiques pour la gélose Oxford :

Cycloheximide : 0,4 g
Sulfate de colistine : 0,02 g
Fosfomycine : 0,01 g
Acridavine : 5,0 mg
Céfotétan : 2,0 mg
Ethanol (solution à 50 p. cent) : 10,0 mL

Sur gélose Oxford, les colonies de *Listeria* apparaissent noires et entourées d'un halo noir.
pH : $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C

Gélose de PALCAM (Polymyxin Acridavine LiCl Ceftazidime Esculine Mannitol)

Peptone : 23,0 g
LiCl : 15,0 g
Agar : 10,0 g
Mannitol : 10,0 g
NaCl : 5,0 g
Extraits de levure : 3,0 g
Amidon : 1,0 g
Esculine : 0,8 g
Citrate de fer ammoniacal : 0,5 g
Glucose : 0,5 g
Rouge de phénol : 0,08 g
Supplément PALCAM : 10,0 mL
Supplément PALCAM :
Ceftazidime : 20,0 mg
Polymyxine B : 10,0 mg

Acriflavine (chlorhydrate) : 5,0 mg

pH : $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C

Bouillon d'enrichissement de Fraser - Composition pour 1 litre

NaCl : 20,0 g

Na₂HPO₄ : 12,0 g

Extraits de viande de bœuf : 5,0 g

Protéose peptone : 5,0 g

Digestion pancréatique de caséine : 5,0 g

Extraits de levure : 5,0 g

LiCl : 3,0 g

KH₂PO₄ : 1,35 g

Esculine : 1,0 g

Acriflavine (25 mg de chlorhydrate d'acriflavine dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

Acide nalidixique (20 mg d'acide nalidixique dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

Citrate de fer ammoniacal (500 mg de citrate de fer ammoniacal dans 10 mL d'eau distillée) : 10 mL

pH : $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C

Gélose TSYEA

Trypticase 17,0 g/L

Soytone 3,0 g/L

Extrait de levure 6,0 g/L

Chlorure de sodium 5,0 g/L

Agar 15 g

pH = 7,3

Annexe 4 : Fiche de renseignement pour sérotypage d'une souche de *Listeria* envoyée au CNR.

SOUCHES DE *Listeria* D'ORIGINE NON HUMAINE

FICHE DE RENSEIGNEMENTS
à retourner à :

CNR des *Listeria*, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15
☎ 01 40 61 31 12, ☎ 01 40 61 35 67, ✉ listeria@pasteur.fr
<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/listeria-index.html>

ADRESSE DU LABORATOIRE EXPEDITEUR	ADRESSE DE FACTURATION

N° D'ANALYSE OU DU BON DE COMMANDE :

REF. SOUCHE ¹ LABORATOIRE EXP	PRELEVEMENT			N° CLIP
	NATURE	DEPARTEMENT	DATE	
				Partie réservée au CNR

¹: indiquer 1 souche par ligne.

- ANALYSES** identification et détermination du groupe PCR des souches de *Listeria*.
- DEMANDEES** typage moléculaire par macrorestriction d'ADN (système PFGE avec *AscI* et *Apal*).
- REFERENCES** n° alerte : alerte DGAI alerte DDSV alerte DGCCRF
 n° DO :
 signalement du :

REMARQUES

Le CNR *Listeria* se réserve le droit de communiquer les résultats des analyses demandées aux administrations appropriées en cas de problème de santé publique

N° d'identification :

TITRE

**INCIDENCE DE SALMONELLA ET LISTERIA
MONOCYTOGENES DANS LES DENREES ALIMENTAIRES.**

BILAN ANALYTIQUE SUR CINQ ANS AU LABORATOIRE VETERINAIRE ET
ALIMENTAIRE DEPARTEMENTAL DE MEURTHE ET MOSELLE (LVAD 54).

Thèse soutenue le 28 mai 2008

Par David COUPIN

RÉSUMÉ :

Salmonella et *Listeria monocytogenes* sont des bactéries que l'on peut trouver dans les denrées alimentaires et présentant un pouvoir pathogène vis-à-vis du consommateur, pouvant même conduire à des intoxications de grandes envergures. Des normes ont été mises en place afin de détecter leur présence dans les aliments d'une manière quantitative et/ou qualitative, et des catégories d'aliments dits sensibles ont été mis en évidence. L'amélioration de l'hygiène est devenue le cheval de bataille de nombre de professionnels et des autorités sanitaires ces dernières années.

L'étude s'est orientée sur les analyses positives à *Salmonella* et à *Listeria monocytogenes* obtenus par le Laboratoire Vétérinaire et Alimentaire Départementale de Meurthe et Moselle (LVAD 54) de 2003 à 2008.

Les résultats ont été analysés pour voir si les restaurateurs de la région de Nancy sont dans les standards de salubrité alimentaire actuels.

Ayant un rôle préventif et non punitif, le LVAD aide les professionnels à évaluer et améliorer la qualité de leur production. Des professionnels qui peuvent également s'appuyer sur les normes actuelles du « paquet hygiène » et des formations HACCP pour tenter d'atteindre l'irréprochabilité.

MOTS CLES :

**SALMONELLA
LISTERIA
TOXI-INFECTIO
SECURITE ALIMENTAIRE**

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Jean Marie BARADEL	Docteur es sciences pharmaceutiques, Chargé de mission en sécurité alimentaire et vétérinaire, Conseil général de Meurthe et Moselle	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 2 4

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle