

50376
1995
191

THESE de L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

Option : MICROBIOLOGIE

Présentée par

Jacqueline THURETTE



LISTERIA ET SAUMONS FUMES :

ACQUISITION DE DONNEES POUR LA MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE.

Soutenu le 27 Septembre 1995 devant la Commission d'Examen

- Président** : . Pr. R. TAILLIEZ (I. A. A. L. Lille I)
- Rapporteurs** : . Dr. J. ROCOURT (Institut Pasteur de Paris)
. Mr L. HAN CHING (IFREMER Nantes)
- Examineurs** : . Pr J. L. JOUVE (Ecole Nationale Vétérinaire Nantes)
. Pr. J. P. HORNEZ (I. U. T. Lille I)
. Mr. GASNIER (Directeur. Assurance Qualité
Recherche - Développement, LABEYRIE)

N° d'Ordre : 1574

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au SERMHA (SERvice de Microbiologie et Hygiène des Aliments) de l'Institut Pasteur de Lille, sous la direction scientifique de Mr CATTEAU. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour m'avoir accueillie et intégrée au sein du laboratoire, et pour m'avoir guidée tout au long de ce travail.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Messieurs FALCONNET (CITPPM, Paris) et HAN CHING (IFREMER, Nantes) pour m'avoir accordé leur confiance et permis de réaliser ce travail de Thèse.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mr le Professeur R. TAILLIEZ, de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, qui me fait l'honneur d'être Président de ce jury de Thèse et qui m'a épaulée ces dernières années.

J'exprime toute ma gratitude à Mme le Dr J. ROCOURT, de l'Institut Pasteur de Paris, pour avoir spontanément accepté d'être Rapporteur de cette thèse et pour avoir été de bon conseil concernant les données épidémiologiques de *Listeria*.

L'expression de ma plus vive reconnaissance s'adresse à Mr HAN CHING, responsable du département "Valorisation des Produits de la mer " à IFREMER, qui a manifesté un intérêt particulier pour ce travail dont il me fait l'honneur d'être Rapporteur.

Je demande à Mr le Professeur J. L. JOUVE, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, qui a accepté de juger ce travail, de trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

J'adresse également mes remerciements à Mr le Professeur J. P. HORNEZ, de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, pour sa participation à ce jury d'examen.

Je tiens à remercier Mr GASNIER, Directeur Assurance Qualité Recherche - Développement de la société LABEYRIE, pour avoir accepté de juger ce travail comme représentant des producteurs de saumon fumé.

L'aboutissement de cette thèse a nécessité le concours de nombreuses personnes auxquelles je tiens à exprimer toute ma reconnaissance :

- Madame LEROI et Messieurs LOREAL et KNOKAERT, de l'IFREMER (Nantes), qui ont participé à l'évolution de ce travail et m'ont permis de bénéficier de leurs compétences dans le domaine du fumage des produits de la mer.

- l'ensemble des producteurs de saumons fumés qui ont suivi avec attention ce travail et ont pris part à cette étude par l'apport d'échantillons.

Je tiens particulièrement à remercier les entreprises qui m'ont reçue dans leur établissement, contribuant ainsi à ma connaissance de la chaîne de production.

- Melle J. M. MEMBRE, de l'INRA de Villeneuve d'Ascq, pour sa collaboration par l'établissement des modèles mathématiques, me permettant de mener à bien l'étude de microbiologie prévisionnelle

A tous les membres du SERMHA, qui m'ont apporté aide et sympathie, j'adresse toute ma reconnaissance et mes remerciements, notamment à l'équipe de Recherche-Développement : Mr J. P. VINCENT, VIRGINIE, ISABELLE, EMMANUELLE, ANNE-MARIE, pour leurs conseils amicaux et leur soutien moral constant.

Je n'oublie certes pas Mr le Professeur H. MORVAN, Messieurs les maîtres de conférence C. DEFIVES et P. MARY qui ont contribué à ma formation à la recherche.

Je remercie chaleureusement Mr P. MARY pour m'avoir conseillée dans la correction de ce mémoire.

Je tiens enfin à exprimer ma profonde reconnaissance à ma famille et mes proches pour leur soutien moral.

RESUME

Les analyses de saumons fumés réalisées sur la ligne de fabrication et à divers stades de conservation, ont montré l'importance de la contamination par les *Listeria* et en particulier *Listeria monocytogenes*.

L'efficacité des techniques utilisées dans cette étude, a été démontrée pour les différents états du saumon (frais ou fumé, réfrigéré ou congelé).

Les méthodes rapides, intégrant des réactions immuno-enzymatiques ou des réactions d'hybridation moléculaire, présentent un délai de réponse de l'ordre de 48 heures, alors que les protocoles traditionnels durent de 5 à 9 jours.

Pour un produit en fin de fabrication, un dénombrement direct précédé d'une étape de revivification est ajouté à la méthode AFNOR V 08-055. Dans le cas d'un produit ayant atteint la Date Limite de Consommation (DLC), l'analyse proposée consiste à effectuer un dénombrement direct suivi d'une identification par sondes nucléiques.

Dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle, un plan factoriel complet à trois facteurs et trois niveaux a été établi. Les facteurs pris en compte sont : la température de stockage, le taux de sel et l'intensité du fumage (mesurée par l'indice de phénols).

La température de stockage de 4°C limite le développement de *Listeria* et une décroissance bactérienne est amorcée pour une combinaison donnée des paramètres opératoires (une température de 4°C et un taux de phénols de 2 mg / 100 ml).

Les données acquises ont permis d'établir un modèle mathématique dont originalité est de prédire l'une ou l'autre des évolutions de *Listeria monocytogenes*, enregistrées dans le même plan expérimental, à savoir : croissance ou décroissance bactérienne. La validité de ce modèle a été vérifiée à l'aide de challenge-tests sur saumon fumé : une bonne corrélation entre valeurs prédites et observées a été obtenue. En outre un effet souche a pu être mis en évidence.

Ce modèle constitue une base de travail pour les prévisions de l'évolution de *Listeria* dans le saumon fumé. La sensibilité de celui-ci pourra être améliorée par l'utilisation de diverses souches de *Listeria* et la multiplication des challenge-tests.

Mots clés : *Listeria*, saumon fumé, microbiologie prévisionnelle, température de stockage, taux de phénols, méthodes.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS..... 18

GENERALITES

I. GENERALITES SUR *LISTERIA*..... 20

I. 1. *LISTERIA SPP* CARACTERISTIQUES DU MICRO-ORGANISME. 20

I. 1. 1. Taxonomie. 20

I. 1. 2. Description 21

I. 1. 3. Caractères biochimiques..... 21

I.1. 4. Structure antigénique 21

I. 1. 5. Virulence. 23

I. 1. 5. 1. Le cycle infectieux de *Listeria monocytogenes*. 23

I. 1. 5. 2. Support génétique de la virulence. 26

I. 1. 5. 3. Hétérogénéité des souches 27

I. 2. LISTERIOSE..... 28

I. 2. 1. Prolifération de *Listeria* dans l'organisme hôte 28

I. 2. 2. Mécanismes de défense chez l'hôte. 28

I. 2. 3. Formes cliniques de la listériose..... 29

I.2. 4. Epidémiologie 30

I. 3. REGLEMENTATION RELATIVE A *LISTERIA MONOCYTOGENES*..... 33

II. *LISTERIA* ET PRODUITS DE LA MER..... 34

II. 1. PRODUITS DE LA MER ET CONTAMINANTS MICROBIENS 35

II. 1. 1. Microbiologie des produits de la mer. 37

II. 1. 2. Contamination des produits de la mer et procédés de transformation de la matière première. 37

II. 1. 3. Mise en évidence d'un nouveau genre bactérien contaminant les produits de la mer..... 39

II. 1. 3. 1. Recherche des *Listeria* dans les produits de la mer..... 39

II. 1. 3. 2. Incidence de *Listeria* dans les différentes catégories de produits de la mer. 40

II. 2. SAUMON FUME ET <i>LISTERIA</i>	42
II. 2. 1. Appellation saumon fumé et diagramme de fabrication.....	42
II. 2. 2. L'origine de la contamination en <i>Listeria</i>	44
II. 2. 3. Comportement de <i>Listeria</i> dans le produit fini.....	46
III. METHODES UTILISEES DANS LA RECHERCHE DES LISTERIA.....	48
III. 1. METHODES TRADITIONNELLES.....	48
III. 1. 1. Etapes d'enrichissement : historique.....	48
III.1. 2. Les agents sélectifs utilisés pour l'enrichissement.....	49
III. 1. 3. Milieux d'isolement.....	50
III. 1. 4. Techniques d'identification des <i>Listeria</i>	51
III. 1. 5. Méthodes reconnues pour la détection des <i>Listeria</i>	53
III. 2. METHODES ALTERNATIVES DE DETECTION DES <i>LISTERIA</i>	61
III. 2. 1. Tests ELISA.....	62
III.2. 2. Hybridation de sondes nucléiques.....	64
IV. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE.....	66
IV.1. GENERALITES.....	66
IV. 2. MODELISATION.....	67
IV. 2. 1. Modélisation d'un seul facteur l'effet de la température.....	67
IV. 2. 2. Modélisation multifactorielle.....	67
IV. 3. ACQUISITION DES DONNEES.....	69
IV. 3. 1. Terminologie.....	70
IV. 3. 2. Choix d'un modèle.....	70
IV.3.3. Choix du domaine expérimental choix des facteurs et de leurs niveaux.....	70
IV. 3. 4. Les plans d'expériences.....	71
BUTS DU TRAVAIL.....	75

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIELS : SOUCHES BACTERIENNES ET PRODUITS

ALIMENTAIRES. 76

I. 1. SOUCHES DE *LISTERIA* 76

I. 2. LES ECHANTILLONS ALIMENTAIRES 76

II. TECHNIQUES DE DETECTION DES *LISTERIA*. 77

II. 1. TECHNIQUES DE RECHERCHE DES *LISTERIA* 77

II. 1. 1. Méthode "IPL". 77

II. 1. 2. Nouvelle technique de recherche des *Listeria* norme AFNOR
V 08-055. 77

II. 1. 3. Identification des espèces de *Listeria*. 81

II. 1. 3. 1. Identification présomptive de *Listeria* 81

II. 1. 3. 2. Identification du genre et de l'espèce. 81

II. 1. 3. 3. Test supplémentaire pour la confirmation de l'espèce
monocytogenes CAMP test (Schéma 4)..... 81

II. 2. ESSAIS IMMUNO-ENZYMATIQUES (EIA). 83

II. 2. 1. Techniques d'enrichissement pratiquées pour les tests
immuno-enzymatiques..... 83

II. 2. 2. Protocole de l'EIA du kit TRANSIA. 83

II. 2. 3. Protocole de EIA du kit TECRA. 85

II. 2. 4. Protocole de l'EIA du kit VIDAS. 85

II. 2. 5. Détermination des seuils de détection des différents kits
immuno-enzymatiques..... 86

II. 3. DETECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A L'AIDE DE
SONDES NUCLEIQUES..... 86

II. 3. 1. Démarche suivie par le kit GENE TRAK *Listeria monocytogenes*..... 86

II. 3. 2. Démarche suivie par le kit GEN PROBE *Listeria monocytogenes*..... 89

II. 4. REVIVIFICATION DES BACTERIES STRESSEES. 91

II. 4. 1. Application d'un stress thermique à une population de *Listeria*. 91

II. 4. 2. Mise en place d'une étape de revivification. 91

II. 4. 3. Revivification appliquée à l'étude d'échantillons de saumon fumé..... 92

III. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE <i>LISTERIA</i> DANS LE SAUMON FUME	92
III. 1. REALISATION DU PLAN D'EXPERIENCES ET MODELISATION.	92
III. 1. 1. Fabrication du milieu de culture support du plan expérimental <i>Listeria</i> Enrichment Broth (LEB).....	92
III. 1. 2. Dosage du NaCl.....	93
III.1. 2. 1. Principe.	93
III. 1. 2. 2. Mode opératoire.	94
III. 1. 3. Dosage des phénols.....	95
III.1. 3. 1. Principe.	95
III. 1. 3. 2. Réactifs.....	95
III. 1. 3. 3. Mode opératoire.	95
III. 1. 4. Inoculation du milieu de culture.	97
III. 1. 5. Suivi de l'évolution de la population <i>Listeria</i>	97
III. 1. 6. Analyse statistique.	97
III. 2. VALIDATION DU MODELE SUR SAUMON FUME, REALISATION DE CHALLENGE - TESTS.....	97
III. 2. 1. Préparation des saumons fumés.....	97
III. 2. 2. Déroulement des challenge - tests.....	98

RESULTATS ET DISCUSSION.

I. ACQUISITION DE DONNEES MICROBIOLOGIQUES DANS LE SAUMON EN COURS DE TRANSFORMATION.	100
I. 1. ETUDE DE L'INCIDENCE DE <i>LISTERIA</i> DANS LE SAUMON FUME DU COMMERCE.	100
I. 2. ETUDE DE DEUX LIGNES DE PRODUCTION DE SAUMON FUME.....	103
I. 3. TESTS DE CONSERVATION DES PRODUITS FINIS.....	107

II. DETECTION DES <i>LISTERIA</i>	112
II. 1. EVALUATION DES TECHNIQUES DE DETECTION DES <i>LISTERIA</i>	112
II. 1. 1. Etude comparative entre la méthode IPL pour la détection des <i>Listeria</i> et le kit immuno-enzymatique commercialisé par TRANSIA.	112
II. 1. 2. Etude comparative entre différents kits immuno-enzymatiques TRANSIA, TECRA, VIDAS.	115
II. 1. 2. 1. Détermination des seuils de détection des trois kits.	115
II. 1. 2. 2. Comparaison des résultats obtenus avec les trois kits immuno-enzymatiques.	116
II. 1. 3. Application de la norme AFNOR V 08-055.....	118
II. 1. 3. 1. Utilisation en parallèle des méthodes IPL et norme AFNOR V 08 -055.	118
II. 1. 3. 2. Comparaison du kit TRANSIA et AFNOR V 08-055.	119
II. 1. 3. 3. Influence du temps de revivification sur la détection des <i>Listeria</i> par la méthode V 08-055 et le kit TRANSIA.....	120
II. 1. 4. Utilisation de sondes nucléiques dans la recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	122
II. 1. 4. 1. Kit GENE TRAK.	122
II. 1. 4. 2. Kit GEN PROBE.	125
 II. 2. ADAPTATION DE LA METHODE DE RECHERCHE DE <i>LISTERIA</i> <i>MONOCYTOGENES</i> (ET DE <i>LISTERIA SPP</i>) DANS LE SAUMON FUME.	128
II. 2. 1. Introduction d'une étape de revivification.....	128
II. 2. 1. 1. Intérêt d'une étape de revivification appliquée à l'analyse de saumons fumés.....	128
II. 2. 1. 2. Détermination des conditions de revivification sur souches pures	131
II. 2. 1. 3. Vérification sur saumons fumés des conditions de revivification établies pour des souches pures.	135
II. 2. 2. Optimisation des techniques de recherche de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> dans le saumon fumé.	138
II. 2. 2. 1. Produit en fin de fabrication (cf Fig 21).	138
II. 2. 2. 2. Produit à DLC (cf Fig 22).	140
II. 2. 2. 3. Identification des <i>Listeria</i>	140
II. 2. 2. 4. Expression des résultats.....	142

III. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE LISTERIA DANS LE SAUMON FUME.....	144
III. 1. DETERMINATION DU PLAN D'EXPERIENCES	144
III. 1. 1. Choix et domaine des facteurs étudiés.....	144
III. 1. 2. Choix des conditions expérimentales.....	146
III. 1. 3. Définition du plan d'expériences.....	146
III. 2. ACQUISITION DES DONNEES ET EFFETS DES DIFFERENTS FACTEURS.....	147
III. 2. 1. Vérification des caractéristiques des milieux.....	150
III. 2. 1. 1. Le taux de phénols.....	150
III. 2. 1. 2. Le taux de sel.....	150
III. 2. 1. 3. Le pH.....	153
III. 2. 2. Evolution de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les différents traitements.....	155
III. 2. 2. 1. Effet de la température.....	155
III.2. 2. 2. Effet de la fumée liquide.....	155
III. 2. 2. 3. Effet du sel.....	159
III. 2. 2. 4. Les interactions entre facteurs.....	160
III. 3. MODELISATION.....	161
III. 3. 1. Choix des modèles : modèle "discontinu" et modèle "continu".....	161
III. 3. 1. 1. Modèle "discontinu"	162
III.3. 1. 2. Modèle "continu".....	164
III. 3. 2. Validité des modèles.....	166
III. 3. 2. 1. Modèle "discontinu".....	166
III.3. 2. 2. Modèle "continu".....	174
III. 4. VALIDATION DU MODELE SUR SAUMON FUME CHALLENGE - TESTS.....	179
III. 4. 1. Caractéristiques physico-chimiques des saumons fumés.....	179
III. 4. 2. Résultats des challenge-tests.....	179
III. 4. 2. 1. Comportement de <i>Listeria</i> dans le saumon fumé.....	179
III. 4. 2. 2. Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle "continu", en fonction de la souche et du taux d'inoculation.....	190
III. 4. 2. 3. Comparaison entre valeurs observées et prédites par le modèle "continu", en fonction du temps de stockage de l'échantillon.....	193
III. 4. 2. 4. Challenge-tests sur saumons fumés et prévisions du " Food Micromodel".....	195

III. 5. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE <i>LISTERIA</i> DANS LE SAUMON FUME : OUTILS GRAPHIQUES.....	201
III. 5. 1. Evaluation de l'évolution de <i>Listeria</i> en fonction des différents facteurs.	201
III. 5. 2. Evaluation de l'évolution de <i>Listeria</i> au cours d'un stockage faisant varier le couple de paramètres temps /température.	201

CONCLUSION GENERALE.215

BIBLIOGRAPHIE.219

ANNEXES.

Bouillon LEB	240
Bouillon UVM.....	241
Bouillon FRASER	242
Bouillon FRASER 1/2.....	243
Gélose TSA	244
Gélose PALCAM.....	245
Gélose OXFORD.....	246
Tampon Phosphate Salin	247

Tableau I :	Sérovars des espèces du genre <i>Listeria</i> .	24
Tableau II :	Principales épidémies de listériose humaine	32
Tableau III :	<i>Listeria monocytogenes</i> . Cas et plans d'échantillonnage proposés pour la vérification.	35
Tableau IV :	Seuils et conclusions relatifs à la contamination des aliments par <i>L. monocytogenes</i> .	36
Tableau V :	Liste chronologique des produits de la mer contaminés en <i>Listeria monocytogenes</i> , retirés de la vente aux USA.	43
Tableau VI :	Critères microbiologiques pour le saumon fumé norme AFNOR NF V 45-065.	42
Tableau VII :	Evolution de la population <i>Listeria</i> dans des produits de la mer contaminés artificiellement.	47
Tableau VIII :	Préparation des saumons fumés ; les caractéristiques des différentes étapes de transformation.	98
Tableau IX :	Incidence de <i>Listeria</i> dans les différentes catégories d'aliments.	101
Tableau X :	Incidence de <i>Listeria</i> dans le saumon fumé du commerce.	102
Tableau XI :	Incidence de <i>Listeria</i> dans le saumon fumé rapportée dans la bibliographie.	102
Tableau XII :	Recherche de <i>Listeria</i> au cours du procédé de transformation, atelier 1	104
Tableau XIII :	Recherche de <i>Listeria</i> au cours du procédé de transformation, atelier 2	105
Tableau XIV :	Tests de conservation à 4°C, entreprise 1.	107
Tableau XV :	Tests de conservation à 4°C, entreprise 2.	107
Tableau XVI :	Tests de conservation à 8°C, entreprise 1.	108
Tableau XVII :	Tests de conservation à 8°C, entreprise 2.	108
Tableau XVIII:	Evolution de la population <i>Listeria</i> dans un lot de saumon fumé en fonction du couple temps /température de stockage.	110
Tableau XIX :	Comparaison entre la méthode IPL et le kit TRANSIA.	113
Tableau XX :	Comparaison de la méthode IPL et le kit TRANSIA pour la catégorie des produits de la mer	114
Tableau XXI :	Evaluation du seuil de détection pour les kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.	115
Tableau XXII :	Utilisation d'un enrichissement primaire en LEB pour l'évaluation des kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.	117
Tableau XXIII :	Utilisation d'un enrichissement primaire en UVM pour l'évaluation des kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.	117

Tableau XXIV :	Nombre d'échantillons positifs détectés en fonction de la durée de l'enrichissement avec la méthode IPL.	116
Tableau XXV :	Comparaison de la méthode IPL et V 08-055 dans l'analyse de saumons fumés.	118
Tableau XXVI :	Saumons fumés congelés ou conditionnés sous vide : comparaison de la technique V 08-055 et le kit TRANSIA	119
Tableau XXVII :	Influence du temps de revivification sur les résultats obtenus par les méthodes V 08-055 et TRANSIA pour l'analyse de saumons fumés.	121
Tableau XXVIII :	Nombre d' échantillons positifs en fonction du temps d'incubation des enrichissements et du temps de revivification obtenus par la méthode V 08-055 et le Kit TRANSIA.	120
Tableau XXIX :	Kit GENE TRAK appliqué à la catégorie des saumons fumés.	123
Tableau XXX :	Recherche de <i>Listeria</i> sur des saumons frais ou congelés selon la norme AFNOR, la méthode GENE TRAK (<i>Listeria monocytogenes</i>) ou le kit immuno-enzymatique TRANSIA.	124
Tableau XXXI:	Recherche de <i>Listeria</i> sur des saumons fumés selon la norme AFNOR et le kit immuno-enzymatiques VIDAS. Les identifications ont été réalisées par le kit GEN PROBE spécifique de <i>L. monocytogenes</i> et galeries API.	127
Tableau XXXII :	Caractéristiques des différents kits utilisés dans la détection de <i>Listeria</i> dans les aliments.	129
Tableau XXXIII :	Expression et interprétation des résultats d'analyse.	142
Tableau XXXIV :	Niveaux des différents facteurs utilisés pour le plan 3 ³ .	147
Tableau XXXV :	Matrice expérimentale du plan factoriel complet 3 ³ utilisée pour l'acquisition des données.	148
Tableau XXXVI :	Dosages de phénols sur les milieux représentant les différentes combinaisons utilisées.	151
Tableau XXXVII :	Variations maximales enregistrées entre deux dosages du même échantillon et entre valeur observée et attendue.	150
Tableau XXXVIII:	Dosages de NaCl sur les milieux utilisés pour la réalisation du plan factoriel complet.	152
Tableau XXXIX:	Variations maximales enregistrées entre deux dosages de sel et entre valeurs observée et attendue.	153
Tableau XXXX :	Récapitulatif de quelques caractéristiques des points du plan factoriel 3 ³ .	154
Tableau XXXXI :	Valeurs des coefficients des paramètres du modèle "discontinu " : cas des croissances.	163

Tableau XXXXII :	Valeurs des coefficients des paramètres du modèle "discontinu" : cas des décroissances.	165
Tableau XXXXIII :	Valeurs des coefficients des paramètres du modèle "continu".	165
Tableau XXXXIV :	Caractéristiques physico - chimiques des différents saumons fumés utilisés pour les challenge-tests.	180
Tableau XXXXV :	Nombre d'échantillons présentant une variation entre valeur observée et valeur prédite par le modèle "continu" inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction de la souche inoculée.	192
Tableau XXXXVI :	Nombre d'échantillons présentant une variation entre valeur observée et valeur prédite par le modèle "continu" inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction du temps de stockage.	196
Tableau XXXXVII :	Nombre d'échantillons présentant un variation entre valeur observée et valeur prédite inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction de la souche inoculée et le modèle de prédiction.	199
Tableau XXXXVIII:	Nombre d'échantillons présentant un variation entre valeur observée et valeur prédite inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction du temps de stockage et le modèle de prédiction.	200
Tableau ID :	Evaluation de la population <i>Listeria</i> au cours d'un stockage faisant varier le couple temps / température.	212
Schéma 1 :	Identification biochimique des espèces de <i>Listeria</i> .	22
Schéma 2 :	Schéma du cycle infectieux de <i>Listeria monocytogenes</i> dans un macrophage.	25
Schéma 3 :	Représentation des gènes intervenant dans l'expression de la virulence chez <i>Listeria monocytogenes</i> ..	25
Schéma 4 :	Test de CHRISTIE, ATKINS et MUNCH-PETERSEN (CAMP test).	82

Fig 1 :	Procédé de transformation du saumon fumé.	45
Fig 2 :	Procédure originale de la FDA pour l'isolement de <i>L. monocytogenes</i> d'aliments, Juin 1985 à Octobre 1988.	55
Fig 3 :	Procédure révisée de la FDA pour l'isolement de <i>L. monocytogenes</i> d'aliments, Octobre 1988 jusqu'en 1990 où le FDA-MMLA a été remplacé par l' Oxford Agar.	55
Fig 4 :	procEDURE de la Provisional Dairy Federation (IDF) pour l'isolement de <i>L. monocytogenes</i> de lait et produits laitiers.	56
Fig 5 :	ProcEDURE originale de l'USDA pour l'isolement de <i>L. monocytogenes</i> de viandes et de volailles. 1986 à Avril 1989.	57
Fig 6 :	ProcEDURE révisée de l'USDA pour l'isolement de <i>L. monocytogenes</i> de viandes et de volailles. May 1989 à Décembre 1991	58
Fig 7 :	Directives générales préconisées par le projet de norme ISO CD 11290 en cours de rédaction.	60
Fig 8 :	Méthode sandwich utilisée dans les tests ELISA pour la recherche de <i>Listeria</i> .	63
Fig 9 :	Schéma de la technique de recherche de <i>Listeria</i> utilisée à l'"IPL".(1992).	78
Fig 10 :	Protocole adopté par l' AFNOR pour le recherche de <i>Listeria</i> (V 08-055).	79
Fig 11 :	Technique inspirée de la norme AFNOR V08-055 utilisée au cours de notre étude .	80
Fig 12 :	Protocole d'enrichissement utilisé pour les EIA.	84
Fig 13 :	Schéma récapitulatif des différentes étapes intervenant au cours du kit GENE TRAK.	87
Fig 14 :	Schéma récapitulatif des différentes étapes intervenant dans le kit GEN PROBE	90
Fig 15 :	Evolution de la population <i>Listeria</i> au cours d'un stress thermique à 55°C.	132
Fig 16 :	Evolution du pourcentage de <i>Listeria</i> lésées en fonction de la durée de traitement thermique à 55°C.	132
Fig 17 :	Evolution de la population de <i>Listeria</i> en fonction du temps de revivification à 20°C en base Fraser.	134
Fig 18 :	Evolution du pourcentage de lésion de <i>Listeria spp</i> au cours du temps de revivification dans une base Fraser à 20°C	134
Fig 19 :	Evolution de la population <i>Listeria</i> en base Fraser à 20°C.	136
Fig 20 :	Evolution de la population <i>L. monocytogenes</i> dans un saumon .	137
Fig 21 :	Recherche de <i>L. monocytogenes</i> sur un saumon fumé en fin de fabrication.	139
Fig 22 :	Recherche de <i>L. monocytogenes</i> dans un saumon fumé à DLC.	141
Fig 23 :	Représentation dans l'espace du plan expérimental.	149
Fig 24 :	Evolution dans la base LEB, de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 en fonction du taux de sel et de la température, à 0,5 mg de phénols / 100 ml.	156
Fig 25 :	Evolution dans la base LEB, de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 en fonction du taux de sel et de la température, à 1,25 mg de phénols / 100 ml.	157

Fig 26 :	Evolution dans la base LEB, de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 en fonction du taux de sel et de la température, à 2 mg de phénols / 100 ml.	158
Fig 27 :	Modélisation de l'évolution de <i>Listeria</i> ; Modèle "discontinu "cas des croissances.	167-169
Fig 28 :	Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle "discontinu", du log N de <i>Listeria</i> en milieu LEB : cas des croissances.	170
Fig 29 :	Modélisation de l'évolution de <i>Listeria</i> ; Modèle "discontinu " : cas des décroissances.	171-172
Fig 30 :	Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle "discontinu", du log N de <i>Listeria</i> en milieu LEB : cas des décroissances	173
Fig 31 :	Modèle "continu " : évolution de <i>Listeria</i> en fonction de la température et du taux de sel, à 0,5 mg de phénols / 10 ml.	175
Fig 32 :	Modèle "continu" : évolution de <i>Listeria</i> en fonction de la température et du taux de sel, à 1,25 mg de phénols / 10 ml.	176
Fig 33 :	Modèle "continu" : évolution de <i>Listeria</i> en fonction de la température et du taux de sel, à 2 mg de phénols / 10 ml.	177
Fig 34 :	Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle "continu", du log N de <i>Listeria</i> en milieu LEB.	178
Fig 35 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % NaCl et stocké à 8°C.	181
Fig 36 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % NaCl et stocké à 4°C.	181
Fig 37 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % NaCl et stocké à 8°C.	182
Fig 38 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9% NaCl et stocké à 4°C.	182
Fig 39 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % NaCl et stocké à 12°C.	183
Fig 40 :	Comparaison des valeurs du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115 prédites et observées, pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % NaCl et stocké à 12°C.	183
Fig 41 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % NaCl et stocké à 8°C.	184

Fig 42 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % NaCl et stocké à 4°C.	184
Fig 43 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % NaCl et stocké à 8°C.	185
Fig 44 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9 % NaCl et stocké à 4°C.	185
Fig 45 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % NaCl et stocké à 12°C.	186
Fig 46 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % NaCl et stocké à 12°C.	186
Fig 47 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % NaCl et stocké à 8°C (log No \approx 3).	187
Fig 48 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % NaCl et stocké à 4°C (log No \approx 2).	187
Fig 49 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % NaCl et stocké à 8°C (log No \approx 2).	188
Fig 50 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9 % NaCl et stocké à 4°C (log No \approx 3).	188
Fig 51 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % NaCl et stocké à 12°C (log No \approx 3).	189
Fig 52 :	Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> prédites et observées, pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % NaCl et stocké à 12°C (log No \approx 2).	189
Fig 53 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115, inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé.	191
Fig 54 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> , inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé.	191
Fig 55 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> , inoculé à un taux de l'ordre de 10^2 UFC / g de saumon fumé.	191

Fig 56 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>Listeria</i> à 7 jours de stockage, sur saumon fumé.	194
Fig 57 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>Listeria</i> à 14 jours de stockage, sur saumon fumé.	194
Fig 58 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>Listeria</i> à 21 jours de stockage, sur saumon fumé.	194
Fig 59 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>Listeria</i> à 28 jours de stockage, sur saumon fumé.	194
Fig 60 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N de <i>L. monocytogenes</i> 4b ATCC 19115, inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé (Food micromodel).	198
Fig 61 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> , inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé (Food micromodel).	198
Fig 62 :	Comparaison des valeurs prédites et observées du log N d'un mélange de <i>Listeria</i> , inoculé à un taux de l'ordre de 10^2 UFC / g de saumon fumé (Food micromodel).	198
Fig 63 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 2% NaCl et 0,5 mg de phénols / 100g.	202
Fig 64 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 2% NaCl et 1,25 mg de phénols / 100g.	202
Fig 65 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 2% NaCl et 2 mg de phénols / 100g.	202
Fig 66 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 3% NaCl et 0,5 mg de phénols / 100g.	203
Fig 67 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 3% NaCl et 1,25 mg de phénols / 100g.	203
Fig 68 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 3% NaCl et 2 mg de phénols / 100g.	203
Fig 69 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 4% NaCl et 0,5 mg de phénols / 100g.	204
Fig 70 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 4% NaCl et 1,25 mg de phénols / 100g.	204
Fig 71 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction de la température, à 4% NaCl et 2 mg de phénols / 100g.	204
Fig 72 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 4°C.	205
Fig 73 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 4°C.	205

Fig 74 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 4°C.	205
Fig 75 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 8°C.	206
Fig 76 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 8°C.	206
Fig 77 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 8°C.	206
Fig 78 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 12°C.	207
Fig 79 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 12°C.	207
Fig 80 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 12°C.	207
Fig 81 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 0,5 mg de phénols / 100 g .	208
Fig 82 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 1,25 mg de phénols / 100 g .	208
Fig 83 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 2 mg de phénols / 100 g .	208
Fig 84 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 0,5 mg de phénols / 100 g .	209
Fig 85 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 1,25 mg de phénols / 100 g .	209
Fig 86 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 2 mg de phénols / 100 g .	209
Fig 87 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 0,5 mg de phénols / 100 g .	210
Fig 88 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 1,25 mg de phénols / 100 g .	210
Fig 89 :	Evolution au cours du temps du log N de <i>Listeria</i> en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 2 mg de phénols / 100 g .	210
Fig 90 :	Evolution de la population <i>Listeria</i> dans un saumon à 0,75 mg de phénols et 3% NaCl, en fonction du couple temps/température de stockage.	213
Fig 91 :	Evolution de la population <i>Listeria</i> dans un saumon à 1 mg de phénols et 3% de NaCl, en fonction du couple temps/température de stockage.	214

ABREVIATIONS

AFNOR :	Association Française de NORmalisation
ALPAMY :	Acriflavine Lithium chloride Phényléthanol Aesculin Mannitol egg Yolk emulsion
ATCC :	American Type Culture Collection
a_w :	Activité de l'eau
CITPPM :	Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes
CLIP :	Collection <i>Listeria</i> de l'Institut Pasteur (Paris)
CPG :	Chromatographie Phase Gazeuse
CSHPF :	Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
DGAI :	Direction Générale de l'Alimentation
DGCCRF :	Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes
DLC :	Date Limite de Consommation
ELA :	Enzyme Immuno-Assay
ELISA :	Enzyme Like Immunosorbent Assay
EHA :	Enhanced Haemolysis Agar
FDA :	Food Drug Administration
HACCP :	Hazard Analysis Critical Control Point
ICMSF :	International Commission of Microbiological Specifications for Foods
IDF :	International Dairy Federation
IPL :	Institut Pasteur de Lille
ISO :	International Standardization Organisation
LEB :	<i>Listeria</i> Enrichment Broth
LPM :	Lithium Phényléthanol Moxalactam agar
MLA :	Mc Bride <i>Listeria</i> Agar
MMLA :	Modified Mc Bride <i>Listeria</i> agar
MOX :	Modified OXford agar
MVJ :	Modified Vogel-Johnson agar
OX :	OXford agar
PALCAM :	Polymyxine Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol
PCR :	Polymerase Chain Reaction
RAPAMY :	Ralovich Acriflavine Phényléthanol Aesculin Mannitol egg Yolk emulsion
RAPD :	Random Amplification of Polymorphic DNA
TSA :	Tryptose Soy Agar
TSB :	Tryptose Soy Broth
TSBYE :	Trypticase Soy Broth Yeast Extract
USDA :	United States Department of Agriculture
UVM :	University of Vermont Medium

AVANT-PROPOS

Parmi les secteurs de transformation des produits de la mer, l'industrie du fumage est l'un des plus dynamiques. Divers produits sont issus de ce secteur comme le saumon, le hareng, la truite ... Le saumon fumé, dont la consommation en France ne cesse d'augmenter, bénéficie de l'approbation du consommateur. Pour répondre à cette demande, la production de filets de saumons fumés s'est développée, confortant la France dans sa place de leader mondial de producteur.

Face à cette expansion, les producteurs par une démarche volontaire ont travaillé à l'élaboration de la norme AFNOR NF V 45-065 pour limiter la disparité des produits. Cette norme définit les dénominations de vente appropriées et spécifie les caractéristiques du saumon fumé comme la qualité du fumage, les ingrédients, le choix de la DLC, les méthodes de contrôle et les critères microbiologiques. Ces critères sont déterminants pour fixer la durée de vie du produit et la recommandation concernant le germe pathogène *Listeria monocytogenes* est délicate à respecter.

Le rôle de l'aliment comme vecteur de transmission de *L. monocytogenes* a été démontré par les épidémies de la décennie 80-90 sur les continents américain et européen.

Le nombre de cas de listériose humaine, rares jusque dans les années 1950, ne cesse de croître avec :

- * l'augmentation de l'espérance de vie et la survie des sujets immuno-déprimés,
- * les progrès techniques dans l'élaboration et la conservation des aliments ;
la conservation prolongée des denrées à basse température et l'introduction de mets "ready to eat" impliquent la constitution d'un réservoir en *Listeria*, pouvant contaminer l'homme,
- * l'amélioration des techniques de détection.

Les cas de listériose se présentent sous forme sporadique ou épidémique. La France a connu plusieurs épisodes épidémiques de listériose dont les plus récents datent :

- * de 1992 avec 279 cas (véhicule majeur impliqué : langue de porc en gelée),
- * de 1993 avec 35 cas (véhicule impliqué : rillettes).

La France connaît actuellement un nouvel épisode épidémique incriminant du brie.

Aux problèmes de santé publique causés par *L. monocytogenes*, viennent se greffer les problèmes d'ordre économique.

Le coût des cas de listériose aux USA pour l'année 1987 peut être évalué à 480 millions de US \$¹⁹⁹⁰, soit un coût moyen de 258 064 US \$¹⁹⁹⁰ par cas (ROBERT et PINNER 1990 rapportée par ROCOURT 1994).

Le coût lié aux aliments plus délicat à estimer peut être approché par des données incomplètes ayant une valeur informative :

- * valeur des retraits effectués par la FDA entre 1985 et 1987 : 15 millions de US \$ ¹⁹⁹⁰
- * coût des contrôles et des retraits des fromages à pâte molle entre 1986 et 1988 : 5,4 millions de US \$ ¹⁹⁸⁸.

Ces données épidémiologiques et économiques confirment l'intérêt de la prévention et de la maîtrise de *L. monocytogenes* dans les aliments, notamment dans le saumon fumé par son statut de mets "ready to eat" et une incidence en *L. monocytogenes* non négligeable.

GENERALITES

I. GENERALITES SUR LISTERIA

I. 1. LISTERIA SPP : CARACTERISTIQUES DU MICRO-ORGANISME.

I. 1. 1. Taxonomie.

Listeria a été longtemps placée dans la famille des *Corynebacteriaceae* avec les genres : *Corynebacterium*, *Erysipelothrix*, *Microbacterium*, *Cellulomonas* et *Arthrobacter* (Bergey's Manual 1957). Elle est classée depuis la dernière édition du Bergey's dans la rubrique des bactéries à Gram positif asporogènes, en forme de bacille, avec les genres *Lactobacillus*, *Erysipelothrix* et *Brochothrix*.

Décrite en 1926, *Listeria monocytogenes* précédemment appelée *Bacterium monocytogenes* et *Listerella hepatolitica*, acquiert sa dénomination actuelle en 1940 (Bergey's Manual 1986). *Listeria monocytogenes* est restée longtemps la seule espèce du genre, à laquelle ont été adjointes *L. denitrificans*, *L. grayi* (1966) et *L. murrayi* (1971).

L. bulgarica aujourd'hui appelée *L. ivanovii*, de sérotype 5 et présentant une forte hémolyse β , a été proposée en 1975 comme une espèce séparée. De nouvelles espèces non pathogènes ont été ajoutées en 1983 : *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri* (FARBER et PETERKIN 1991).

Jusqu'en 1987, le genre *Listeria* comprenait 8 espèces. Des études de taxonomie numérique, de caractérisation chimiotaxonomique ont établi que *L. denitrificans* était une bactérie corynéforme. En 1987, *L. denitrificans* a été reclassée dans un nouveau genre sur la base du séquençage de l'ARN 16 S : *Jonesia*. (FARBER et PETERKIN 1991)

De même, sur la base de la composition en ADN et des études d'hybridation ADN-ADN, STUART et WELSHIMER ont proposé en 1974 de créer un nouveau genre : *Murraya* avec comme espèces : *M. grayi subsp grayi* et *M. grayi subsp murrayi* (Bergey's Manual 1986, DONNELLY 1994).

Des études de taxonomie numérique et de séquençage de l'ARN ribosomique 16s ont permis de conclure à l'appartenance du genre *Listeria* à la branche dite des *Clostridium* avec les genres *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Kurthia* et *Brochothrix* qui est le genre le plus proche de *Listeria* (ROCOURT 1990, FARBER et PETERKIN 1991).

Aujourd'hui, selon la neuvième édition du Bergey's Manual 1994 *Listeria* est classée dans le groupe 19 avec les genres *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Caryophanon*, *Kurthia*, *Lactobacillus* et *Renibacterium*. Le genre *Listeria* inclue les espèces suivantes : *monocytogenes*, *innocua*, *welshimeri*, *seeligeri*, *ivanovii*, *grayi*.

I. 1. 2. Description .

Listeria monocytogenes est un petit bacille Gram positif de 0,4- 0,5 μm de diamètre et d'une longueur de 0,5-2 μm , aux extrémités arrondies. Dans les cultures jeunes, elle est observée sous forme de petites chaînes positionnées parallèlement décrivant une formation en palissade. Dans des cultures plus âgées (3 à 4 jours) *Listeria* peut apparaître sous forme cocoïde, présentant un aspect de filament (Bergey's Manual 1986, LOVETT 1989, HITCHINS 1992).

Listeria possède 1 à 4 flagelles, dont l'implantation est péritriche. Ceux-ci lui confèrent une mobilité caractéristique en forme d'ombrelle, en milieu gélosé à 20°C. Des températures supérieures (30°-37°C) affectent l'expression du développement des flagelles, *Listeria* apparaissant alors non mobile. Bien qu'une capsule ait été observée dans des conditions précises de culture par SMITH et METZGER (1962), les travaux de SEELIGER ne confirment pas la présence d'une capsule (Bergey's Manual 1986). *Listeria monocytogenes* est considérée comme acapsulée.

I. 1. 3. Caractères biochimiques.

Listeria est catalase positive, oxydase négative, ne possède pas de nitrate réductase (sauf *L. murrayi*). Elle hydrolyse l'esculine mais non l'urée, ne produit pas d'indole ni d'hydrogène sulfuré. Elle fermente en 24 à 48 heures, sans production de gaz, des substrats hydrocarbonés (le glucose, le maltose, le tréhalose...). L'identification de l'espèce de *Listeria* est basée sur l'utilisation de certains sucres comme le rhamnose, le xylose (cf Schéma 1) mais aussi sur l'existence d'une activité B hémolytique. Celle-ci est mise en évidence sur gélose au sang de mouton défibriné par le test de CHRISTIE, ATKINS et MUNCH-PETERSEN (CAMP test cf Matériel et méthodes) (VASQUEZ *et al.* 1990, ROCOURT 1988).

Capable de se développer à 4°C, *Listeria* constitue un véritable problème pour la conservation des aliments.

I. 1. 4. Structure antigénique.

Le schéma sérologique actuel de *Listeria* établi en 1940 par PATERSON est basé sur les antigènes somatiques "O" et flagellaires "H". Ce schéma complété par les travaux de SEELIGER et DONKER-VOET a abouti à la définition de 16 sérovars du genre *Listeria* qui résultent de la combinaison de 14 antigènes somatiques (I à XIV) et de 5 antigènes flagellaires (A à E) (SEELIGER 1975).

Il existe quelques réactions croisées entre les souches de *Listeria* et certaines bactéries Gram positif comme les *Staphylococcus*, les *Enterococcus* et *Escherichia coli* (Bergey's Manual 1986, LOVETT 1989).

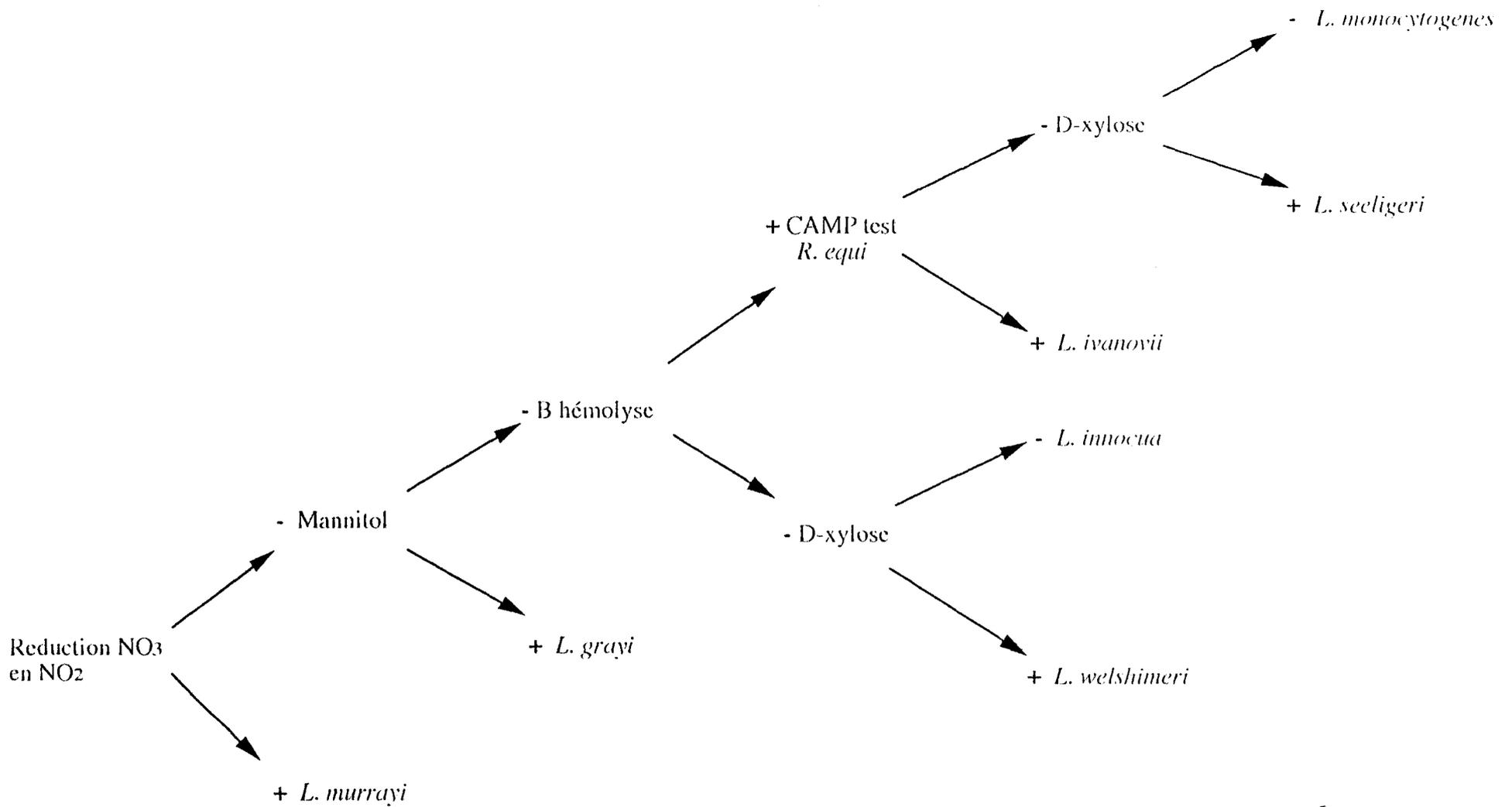


Schéma 1 : Identification biochimique des espèces de *Listeria*. (ROCOURT 1988).

Les sérotypes des cinq espèces principales de *Listeria* sont rapportés dans le Tableau I (HITCHINS 1992, SEELIGER 1975). A l'exception du sérovar 5 qui correspond uniquement à des souches appartenant à l'espèce *ivanovii*, il n'existe pas de corrélation entre sérovars et espèces du genre *Listeria*. Par exemple, *L. monocytogenes* possède 13 sérovars différents, (Tableau I). Les sérovars 4b, 1/2b et 1/2a sont impliqués dans 90% des cas de listériose humaine (ANONYME 1991 b, Recommandation by the national advisory committee on Microbiological criteria for foods).

La structure biochimique de la paroi cellulaire est typique de celle des bactéries Gram positif. Elle est constituée à 35% de peptidoglycane avec principalement l'acide méso-diaminopimélique. Les acides téichoïques représentent un autre élément important de la paroi et peuvent être substitués par des glycolipides comme le galactosyl - glucosyl diglycérade (FARBER et PETERKIN 1991). Toutes les souches étudiées renferment principalement les acides gras suivants: l'acide 14-méthyl hexadécanoïque (anté-iso C17 : 0) et l'acide 12-méthyl-tétradécanoïque (anté-iso C 15 : 0) (Bergey' Manual 1986, NINET *et al.* 1992 b, LARPENT 1995). Les dérivés glucidiques souvent associés aux sérovars 1 et 2, communément appelés 1/2, sont la glucosamine et le rhamnose, le sérovar 3 contient du galactose, du rhamnose et de la glucosamine, alors que les sérovars 4a et 4b renferment du glucose et du galactose (Bergey' s Manual 1986).

I. 1. 5. Virulence.

Sur les sept espèces du genre *Listeria*, seule *Listeria monocytogenes* est considérée comme pathogène pour l'homme. *Listeria ivanovii* occasionnellement pathogène chez l'animal a été rencontrée seulement dans trois cas de listériose humaine, et un seul cas de listériose causé par *Listeria seeligeri* a été rapporté (Mc LAUCHLIN 1987, ROCOURT 1988, ANONYME 1991 b, DONNELLY 1994). *L. innocua* et *L. welshimeri* sont considérées comme non pathogènes et représentent un intérêt particulier comme indicateur de contamination de l'espèce *L. monocytogenes*.

I. 1. 5. 1. Le cycle infectieux de *Listeria monocytogenes*.

La première étape de l'infection à *Listeria* repose sur la pénétration de la bactérie dans les cellules hôtes. Des expérimentations réalisées *in vitro* ont montré que *L. monocytogenes* est capable d'infecter des lignées cellulaires très variées comme les fibroblastes, les hépatocytes, les cellules hépithéliales, les macrophages.

Cette propriété a permis l'observation du cycle infectieux de la bactérie (COSSART 1992, TILNEY et TILNEY 1993) (Schéma 2).

<i>Listeria spp</i>	Sérovars		Antigènes somatiques "O"							Antigènes flagellaires "H"					
<i>L. 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>L. ivanovii</i>	5			(III)	(V)	VI		(VIII)		X		A	B	C	
<i>L. innocua</i>	6a			(III)	V	(VI)	(VII)		(IX)			XV	A	B	C
	6b			(III)	(V)	(VI)	(VII)		IX	X	XI		A	B	C
	4 ab			(III)	V	VI	VII		IX	X			A	B	C
<i>L. 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>L. 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 I : Sérovars des espèces du genre *Listeria* (Larpen 1995).

(...) antigène pas toujours présent.

Schéma 2 : Schéma du cycle infectieux de *Listeria monocytogenes* dans un macrophage. TILNEY et TILNEY 1993.

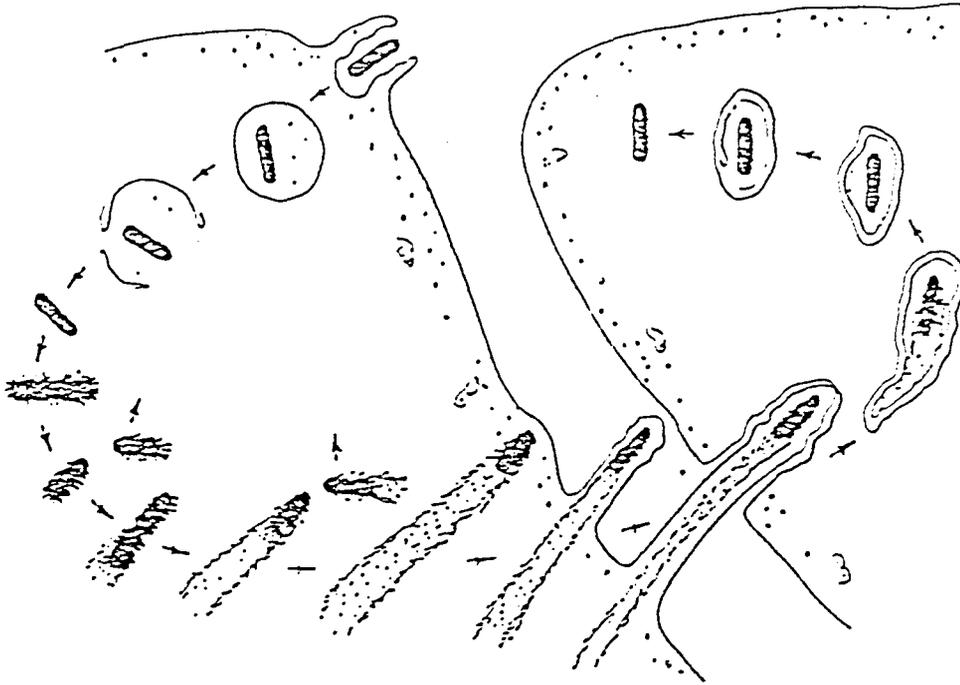
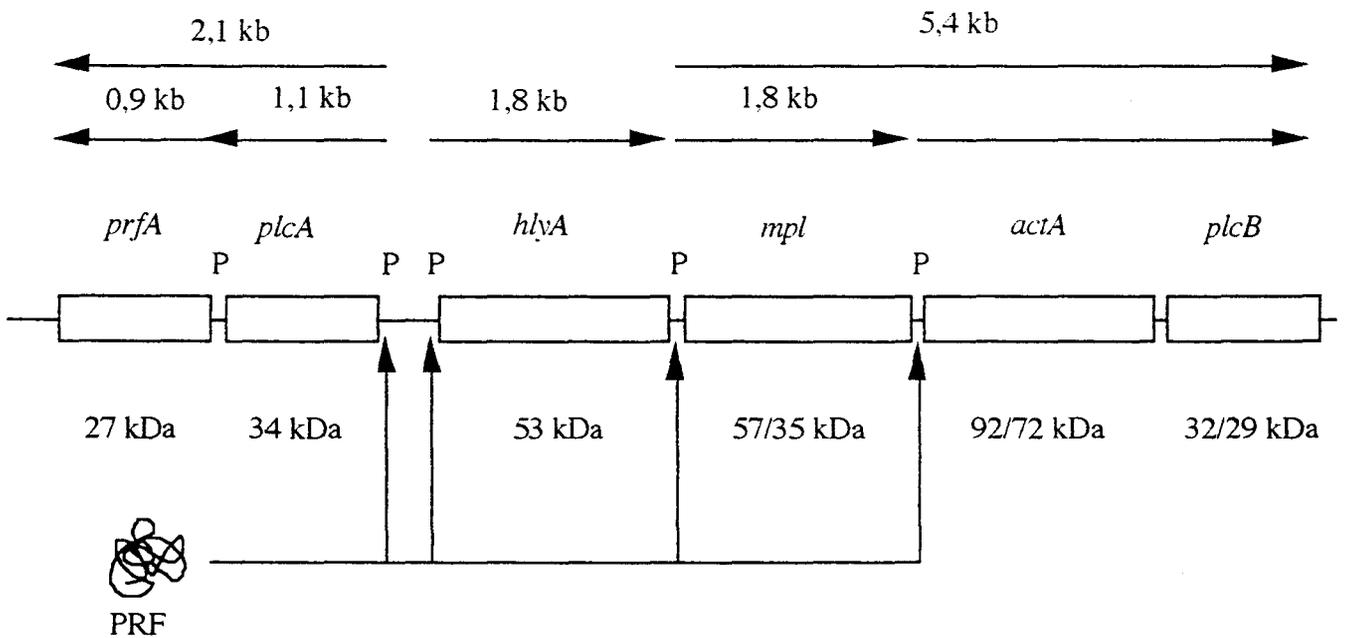


Schéma 3 : Représentation des gènes intervenant dans l'expression de la virulence chez *Listeria monocytogenes*. SOKOLOVIC *et al.* 1993.



* *Listeria* est phagocytée par des macrophages ou induit son entrée dans des cellules non phagocytaires par un mécanisme proche de la phagocytose. Pour cette raison, *L. monocytogenes* est considérée comme une bactérie invasive.

* Trente minutes après son entrée dans la cellule hôte, *L. monocytogenes* lyse la vacuole l'emprisonnant, pour se retrouver libre dans le cytosol où elle peut se répliquer.

In vivo comme *in vitro*, la survie et la multiplication de *L.monocytogenes* dans la cellule hôte sont des propriétés lui conférant une partie de son pouvoir pathogène.

* Parallèlement à la multiplication, des mouvements inter et intracellulaires ont été observés en immunofluorescence. La bactérie par l'intermédiaire de la polymérisation de l'actine cellulaire se déplace dans le cytosol pour atteindre la membrane de la cellule hôte. La déformation de cette membrane engendre des pseudopodes qui s'invaginent dans la cellule adjacente donnant naissance à une vacuole à deux membranes.

* La lyse de la vacuole à deux membranes, phase finale du cycle d'infection, permet de réinitier un nouveau cycle.

I. 1. 5. 2. Support génétique de la virulence.

Des études génétiques utilisant la mutagenèse par transposition, conjugaison ou l'introduction de plasmides par électroporation ont permis d'établir en partie les bases génétiques de la virulence de *L. monocytogenes*.

Un ensemble de cinq gènes (Schéma 3) et un opéron constitué de deux gènes interviennent dans l'expression de la virulence .

* L'opéron appelé *inlAB* pour internalisation, comprend deux gènes : *inlA* et *inlB*. *inl A* confère des propriétés d'invasivité à une espèce non invasive alors qu'*inlB* n'augmente pas cette propriété.

La protéine InlA, baptisée internaline, est exprimée à la surface de la bactérie et pourrait interagir avec un récepteur cellulaire non identifié, lors de l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte (COSSART 1992).

* L'expression de la virulence de *Listeria monocytogenes* est déterminée par l'intervention de cinq autres gènes : *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* et *plcB* (GOEBEL *et al.* 1993).

- *plcA*, codant pour une phosphatidyl inositol spécifique phospholipase C, intervient au cours de la propagation dans les cellules adjacentes (GOEBEL *et al* 1993).

- *L. monocytogenes* est hémolytique et le gène *hly* est responsable de ce phénotype, codant pour une protéine appelée listeriolysine O.

Celle-ci fait partie de la famille des toxines thiol-activées et est capable de se fixer sur le cholestérol des membranes, où elle s'oligomérisse pour former des pores laissant échapper le matériel cellulaire.

Une étude menée par TABOURET *et al.* 1991, a mis en évidence la relation existant entre la pathogénicité, chez la souris immunocompromise, de *L. monocytogenes* provenant de prélèvements cliniques ou alimentaires et la production de listeriolysine.

L. monocytogenes doit avoir une activité hémolytique pour être virulente, par contre une *Listeria* possédant un pouvoir hémolytique n'est pas nécessairement virulente. L'absence de virulence chez des souches ayant une activité hémolytique indique qu'il existe d'autres facteurs de virulence.

- Le gène *mpl* code pour une métalloprotéase intervenant vraisemblablement dans la maturation de protéines exprimées lors du phénomène de virulence (SOKOLOVIC *et al.* 1993).

- Le gène *actA* intervient dans l'étape du mouvement intra et intercellulaire engendré par la polymérisation de l'actine intracellulaire (COSSART 1992).

- Le gène *plcB* codant pour une seconde phospholipase C avec une activité lecithinase, est impliqué dans l'étape de la lyse de la vacuole à deux membranes et permet ainsi le passage de cellules à cellules.

I. 1. 5. 3. Hétérogénéité des souches

Une étude du nombre de bactéries viables, dans la rate de souris immunocompétente, 2 jours après l'inoculation, a démontré l'hétérogénéité de la virulence des souches de *L. monocytogenes* isolées chez l'homme, chez l'animal et d'aliments (BROSCH *et al.* 1993).

Sur 125 souches de *L. monocytogenes* étudiées, le dénombrement des bactéries dans la rate est compris entre 10^3 à 10^8 UFC / organe.

88% de souches présentent un dénombrement compris entre 10^6 et $4 \cdot 10^8$ UFC / organe.

Aucune différence systématique de la virulence n'a pu être détectée entre les souches d'origine clinique ou alimentaire ou selon les marqueurs de typage.

En conclusion, il semble donc que toutes les souches appartenant à l'espèce *monocytogenes* doivent être considérées comme potentiellement virulentes et potentiellement dangereuses pour la santé de l'homme.

I. 2. LISTERIOSE.

I. 2. 1. Prolifération de *Listeria* dans l'organisme hôte

La souris est un des modèles expérimentaux le plus utilisé pour l'étude de la virulence des souches de *Listeria*.

L'inoculation de *L. monocytogenes* à des souris par voie orale ou intrapéritonéale, permet de mieux connaître le devenir de *Listeria* après son ingestion (LAMMERDING *et al.* 1992).

Une fois dans le tractus gastrointestinal, *Listeria* se trouve confrontée à la barrière constituée par les cellules épithéliales de l'intestin. La pénétration de ces cellules épithéliales est la première étape dans l'établissement de l'infection.

Listeria monocytogenes peut être détectée rapidement dans les macrophages du jejunum et de l'ileum, 12 heures après l'inoculation. Suite à l'invasion de l'intestin, *L. monocytogenes* est détectée, un jour après l'inoculation, dans le foie et la rate, où la bactérie est capable de se multiplier. Parallèlement à la chute du nombre de *L. monocytogenes* retrouvées dans l'intestin, une augmentation des *Listeria* dans la rate et le foie est observée.

La première mise en évidence de *L. monocytogenes* au niveau du placenta se fait tout aussi rapidement. mais l'augmentation de la population de *Listeria* se situe trois jours après l'inoculation pour être maximale à 4 et 5 jours.

Dans le cas de *L. innocua*, la colonisation de l'intestin est identique. La prolifération dans ces organes n'est pas observée, cependant une faible population de *L. innocua* peut être retrouvée dans le foie, la rate, le placenta et le fœtus, 1 à 3 jours après l'inoculation. .

I. 2. 2. Mécanismes de défense chez l'hôte .

La réponse immunitaire mise en place pour répondre à une invasion de type bactérienne peut être de trois ordres impliquant : une immunité innée (l'intervention de neutrophiles, de macrophages, de cellules tueuses), une immunité de type humorale (intervention d'anticorps) ou une immunité par médiation cellulaire (lymphocytes T et B).

Dans le cas d'une infection due à *L. monocytogenes*, une réponse par anticorps est considérée classiquement comme non protectrice (CZUPRYNSKI 1994, ETTRIQUI 1994).

Le principal mécanisme de défense impliqué lors d'une infection à *Listeria monocytogenes* est l'immunité par médiation cellulaire (DONNELLY 1994, CZUPRYNSKI 1994).

Une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire due par exemple à une thérapie immunosuppressive ou à un certain état (age avancé, maternité), favorise le développement d'une listériose.

La forte incidence chez les nouveau-nés et les personnes âgées semble refléter le manque de maturité du système immunitaire dans le premier cas et le déclin de ce système dans le deuxième cas.

Ces constatations nous amènent à individualiser des "populations à risque" : cancéreux, transplantés, cirrhotiques, personnes âgées, femmes enceintes, diabétiques, personnes atteintes du SIDA...(ANONYME 1991 a, FARBER et PETERKIN 1991, DONNELLY 1994).

Il est à noter cependant qu'une partie de la population atteinte de listériose concerne des personnes en bonne santé ne présentant pas de facteur risque connu. Ces infections sont en général attribuées à une ingestion importante de *Listeria* ou à une exceptionnelle virulence de la souche incriminée, mais il est vraisemblable que la résistance variable des individus soit aussi en cause (VARNAM et EVANS 1991).

La répartition ubiquitaire de *L. monocytogenes* permet un contact fréquent avec l'homme, ce qui n'entraîne pas nécessairement le développement de la maladie. La proportion de porteurs sains est estimée à 5 voire 15% (VARNAM et EVANS 1991, DONNELLY 1994).

I. 2. 3. Formes cliniques de la listériose.

Décrite pour la première fois en 1929, la listériose humaine a une forte incidence chez deux catégories de patients : le nouveau-né et l'adulte âgé. Dans ces deux cas, l'infection se caractérise par une septicémie de gravité variable atteignant ou non le système nerveux central et pouvant entraîner une létalité de 30%.

La forme foeto-maternelle est une infection bénigne pour la mère. Elle se manifeste par un syndrome pseudo grippal, douleurs lombaires, infection urinaire, diarrhée mais jamais de méningite. L'évolution de l'infection listérienne conduit souvent chez la mère à la naissance d'un enfant prématuré.

Par contre elle est très grave chez le fœtus où quatre modes de contamination ont été décrits (ROCOURT 1989) :

- la voie hématogène trans placentaire (infection maternelle et passage de *Listeria monocytogenes* dans le placenta puis dissémination dans toute la masse pour atteindre le fœtus par voie sanguine)
- la voie ascendante transmembranaire (le point de départ est cervico-vaginal puis *Listeria* pénètre la cavité amniotique entraînant une infection de l'enfant par ingestion-aspiration du liquide amniotique, selon la précocité de la contamination l'enfant souffre d'une méningite ou naît sain).
- Contamination d'origine endométriale (l'origine est un foyer endométrial sans conséquence pour la mère et l'enfant en absence de complication, sinon la

contamination de l'amnios et du cordon entraîne une infection septicémique grave du fœtus (*granulomatosis infantiseptica*).

- contamination lors de la traversées des voies génitales

La listériose du nouveau-né peut se présenter sous deux formes (ROCOURT 1989). La forme précoce, survenant le plus souvent chez les prématurés, intervient avant le quatrième jour après la naissance et se manifeste par une septicémie (syndrome infectieux net, signes cutanés et muqueux, troubles respiratoires, signes neurologiques et signes digestifs).

La forme dite tardive apparaît plus chez l'enfant né à terme et se manifeste 7 à 21 jours après la naissance. Le nouveau-né souffre d'une méningite (1er signes : fièvre, troubles digestifs puis altération de l'état général, troubles du rythme respiratoire et signes méningés (raideur de la nuque, tension des fontanelles, convulsions), ou plus rarement de conjonctivite.

La listériose de l'adulte se traduit le plus souvent par une septicémie isolée ou accompagnée d'une infection du système nerveux central (méningites, méningo encéphalites et plus rarement encéphalites). Diverses localisations ont été signalées telles l'endocardite, pleurésie, hépatite, péritonite, conjonctivite, arthrite ou listériose cutanée (ROCOURT 1989).

I. 2. 4. Epidémiologie.

La listériose est essentiellement diagnostiquée dans les pays industrialisés. Il n'est pas possible de dire si cette maladie est absente dans les autres pays ou non diagnostiquée.

L'incidence de la listériose est variable d'un pays et d'une année à l'autre. La plus faible incidence est enregistrée au Canada avec 0,2 cas par million d'habitants en 1987 (ROCOURT 1989) contre 2,3 cas en 1988 (FARBER et PETERKIN 1991). Les plus fortes incidences sont enregistrées en Europe, notamment en France avec 15 cas par million d'habitants en 1986 (FARBER et PETERKIN 1991, ROCOURT 1990).

L'épidémiologie de la listériose humaine se présente très schématiquement sous trois formes : les cas sporadiques, les infections nosocomiales et les épidémies.

Les infections nosocomiales sont rares et peu importantes. Elles surviennent essentiellement dans les maternités. Le premier nouveau-né naît infecté et présente souvent une septicémie. Le deuxième enfant né, peu de temps avant ou après, manifeste dans les 8 à 12 jours qui suivent les signes d'une listériose méningée. Cette contamination peut s'étendre à plusieurs nouveau-nés. Les actes médicaux (accouchements dans la même salle soins, dans la même nursery) et le matériel (thermomètres, incubateurs, sonde d'aspiration) ont été incriminés (ROCOURT 1989).

Les cas sporadiques constituent la majeure partie des cas de listériose diagnostiqués. L'origine de ces cas reste en général inconnue la transmission interhumaine est possible mais très

rare. L'origine alimentaire est souvent soupçonnée sans qu'aucune preuve bactériologique puisse être avancée. Dans de rares cas, une analyse bactériologique rapide des aliments consommés par le patient a permis de confirmer l'origine alimentaire de l'infection.

Cette infection évolue sous forme sporadique parfois amplifiée de bouffées pouvant conduire à de véritables épidémies. La mise en place de systèmes de surveillance de cette maladie dans certains pays comme la France, la Belgique, le Danemark, la Grande Bretagne, le Canada et les USA, a pour but de détecter les bouffées épidémiques dès leur émergence et de rechercher le lien épidémiologique entre l'infection et les aliments contaminés (ROCOURT 1990). L'augmentation anormale des cas de listériose et la mise en évidence d'une même souche dans la majorité des cas constituent les deux critères qui définissent une épidémie de listériose selon l'OMS.

La première épidémie de listériose répondant à ces critères remonte à 1960-1961 en Allemagne. Rare jusque dans les années 1980, le nombre des épidémies a considérablement augmenté depuis quelques années (Tableau II).

Les épidémies observées sur le continent nord américain et en Suisse ont contribué à la compréhension de l'épidémiologie de l'infection en démontrant l'origine alimentaire de cette maladie. Les connaissances acquises reposent sur le typage des souches incriminées. Le succès du typage est conditionné par trois critères : la rapidité, la facilité de mise en oeuvre et le pouvoir de différenciation de souches très proches. Le typage est effectué à l'aide de méthodes phénotypiques (sérotypie et lysotypie) (ROCOURT 1988, FARBER et PETERKIN 1991, SCHUCHAT *et al.* 1991, LARPENT 1995) simples et rapides, mettant en évidence les grandes lignes épidémiologiques.

Leur inadéquation à la discrimination des souches très proches nécessite l'utilisation de méthodes de typage moléculaire. Celles-ci sont basées sur la caractérisation des protéines et de l'ADN (SCHUCHAT *et al.* 1991, ROCOURT 1994 a, ROCOURT et JACQUET 1995, LARPENT 1995).

Les profils d'isoenzymes mettent en évidence deux groupes. Le premier groupe est constitué de souches de sérovar 4b et 1/2b et le deuxième des sérovars 1/2a et 1/2c. Des subdivisions plus fines permettent de définir au moins 45 électrophorotypes pour *L. monocytogenes*.

Sur la base de la caractérisation de l'ADN, plusieurs techniques ont été mises au point :

- le ribotypage : avec la sonde pBA2, deux groupes émergent pour *L. monocytogenes*. Le premier rassemble 89% des souches du sérovar 4b et 64% de souches d'origine humaine. Le deuxième représente 48% de souches du sérovar 1/2 et 42% de souches isolées d'aliments ou de l'environnement.
- les profils de restriction d'ADN réalisés avec des enzymes générant de nombreux fragments de restriction séparés, par électrophorèse conventionnelle.

Localisation	Année	Nombres de cas	Sérovars	Véhicules majeurs
Allemagne (Brème)	1960-1961	81	4b	
Allemagne (Brème)	1963	20	4b	
Allemagne (Halle)	1966	281	1/2	
Nlle Zélande (Auckland)	1969	20	4b	
France (Anjou)	1975-1976	167	4b	
Afrique du sud (Johannesburg)	1977-1978	14	4b	
USA (Boston)	1979	23	4b	"Végétaux, lait"
Nlle Zélande (Auckland)	1980	29	1/2b	"Poisson cru"
Grande -Bretagne	1981	11		crème
Canada (Nouvelle Ecosse)	1981	41	4b	Coleslaw
Nlle Zélande (Christchurch)	1981-1982	18	4b	
USA (Houston)	1983	10	1/2b	
USA (Boston)	1983	49	4b	Lait pasteurisé
Allemagne (Basse saxe)	1983	24	4b	
Suisse (canton Vaud)	1983-1987	122	4b	fromage
Allemagne (Magdeburg)	1985	17	4b	
USA (Californie)	1985	142	4b	fromage
Autriche (Linz)	1986	20	1/2a	"lait cru, végétaux"
USA (Philadelphie)	1986-1987	37		"crème glacée, salami"
Grande-Bretagne	1987-1989-	>300		paté
USA (Conecticut)	1989	9		crevette
France (Strasbourg)	1989	14		
France	1992	279	4b	langue de porc
France	1993	35	4	rilette
France	1995	32 *	4	Brie de Meaux

Tableau II : Principales épidémies de listériose humaine

(A partir des références suivantes : ROCOURT 1989, FARBER et PETERKIN 1991, ROCOURT et al 1994, LARPENT 1995)

" " : origine supposée et non démontrée

* résultats au 29/06/95

- les profils de restriction d'ADN réalisés avec des enzymes générant peu de fragments de restriction à haut poids moléculaire, séparés par électrophorèse en champ pulsé. Plus de 70 combinaisons ont pu être définies pour l'espèce *monocytogenes* avec l'utilisation des enzymes *ApaI*, *SmaI* et *NotI*.

- la RAPD (Random Amplification of Polymorphic ADN), faisant appel à la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) et une amorce constituée d'une séquence arbitraire de 10 nucléotides, permet, après électrophorèse des fragments amplifiés, de différencier les souches de *Listeria*. Cette dernière méthode, simple et rapide, est relativement récente comme outil épidémiologique (CZAJKA et BATT 1994, BOERLIN *et al.* 1995.)

I. 3. REGLEMENTATION RELATIVE A *LISTERIA MONOCYTOGENES*.

Dans le but de protéger la santé publique, plusieurs pays ont défini des critères microbiologiques concernant *L. monocytogenes*.

Un critère microbiologique est défini comme "l'ensemble d'éléments qualitatifs et quantitatifs définissant les caractéristiques microbiologiques essentielles attendues d'un produit donné et qu'il est possible d'atteindre par des interventions appropriées" (JOUVE 1993 b).

En pratique, il existe une grande variété de dispositions et de recommandations différentes au sujet des spécifications applicables au produit fini.

Les USA ont adopté l'application strict du concept de "zéro tolérance" dans 25 g couplé au rappel des produits renfermant *Listeria monocytogenes*. La Suisse moins restrictive applique pour sa part la "zéro tolérance" dans 10 g, uniquement aux produits "ready to eat". Une attitude plus nuancée définissant des limites de tolérance évaluées en fonction du type de l'aliment, le risque qu'il constitue (contamination et recontamination, support de la multiplication), la possibilité de destruction de *Listeria* au cours du procédé de transformation et le consommateur final (population cible) a été adoptée par d'autres pays : Pays Bas, Allemagne, France.

La position allemande est basée sur un système d'actions régulatrices en prenant en compte la catégorie d'aliments et le taux de contamination ($<10^{-2}$, 10^2-10^4 , $>10^4$) (JOUVE)

Les denrées alimentaires sont classées selon les quatre catégories suivantes :

- I. Aliments pour nourrissons et enfants en bas age
- II. Aliments traités thermiquement en récipient étanches ou emballés de façon aseptique
- III. Aliments traités thermiquement mais dont les traitements ultérieurs permettent la recontamination
- IV Aliments crus (ready to eat).

L'ICMSF (International Commission for Microbiological Spécifications for Foods) a publié des plans d'échantillonnage pouvant servir de guide aux opérateurs, dans la mise en oeuvre

des actions destinées à vérifier la maîtrise de la sécurité vis à vis de *L. monocytogenes*. (Tableau III).

Lorsque les aliments sont destinés à des catégories de consommateurs à haut risque, les critères et les plans d'échantillonnage les plus stricts devraient être utilisés (cas 13, 14, 15).

Pour une population "normale", le danger peut être caractérisé comme "modéré" auquel il est recommandé d'appliquer les cas 10, 11, 12 (JOUVE 1994).

En France, le CSHPF (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France) considère que :
 " - il y a lieu de retirer de la consommation humaine en l'état les produits ayant subi un traitement assurant la destruction de *Listeria monocytogenes* dès que ces produits sont contaminés par *Listeria monocytogenes*. "

" - pour les produits dont la contamination en *L. monocytogenes* ne peut être évitée à l'heure actuelle, il faut interpréter la présence de *L. monocytogenes* en tenant compte d'un ensemble d'éléments : nature des produits ; stade de prélèvement ; mode d'utilisation ; leur implication dans des accidents liés à leur consommation ; le taux de *L. m.* rencontré dans les aliments et leur possibilité de s'y développer ; durée de vie du produit. Pour ces produits, le CSHPF indique que la limite entre l'acceptable et le risque pour le consommateur, d'après les données épidémiologiques publiées dans la littérature, est de 100 *Listeria monocytogenes* par gramme au stade de la consommation" (BID N° 1 1993).

Le Tableau IV reprend les différentes conclusions relatives à la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes* (Note de service DGCCRF N° 6010 du 11/ 01/ 1994).

II. LISTERIA ET PRODUITS DE LA MER.

II. 1. PRODUITS DE LA MER ET CONTAMINANTS MICROBIENS .

Les produits de la mer sont parmi les denrées alimentaires les plus périssables. Des teneurs en eau et en composés azotés non protéiques élevées, un pH compris entre 6,1 et 6,9 rendent ceux-ci plus sensibles à l'altération que les produits carnés (SAINCLIVIER 1983.)

La composition globale d'un poisson dit "maigre" (ex : haddock, morue) est la suivante : protéines 20%, matière grasse 1%, carbohydrates 1% et 76 à 78 % d'eau. Les poissons "gras" (ex: hareng, maquereau, saumon) sont caractérisés par un pourcentage très variable en matière grasse et en eau (dépendant de la teneur en matière grasse) respectivement compris entre 3 et 25 %, 55 à 75 %. Le pourcentage en protéines, en carbohydrates est respectivement de l'ordre de 15 à 20% et 1% (HOBBS et HODGKISS 1982). Ces compositions sont fonction de l'espèce considérée et peuvent varier selon la saison et le cycle sexuel.

Catégories de consommateurs	Danger sanitaire	Modalités prévisibles de manipulation et d'utilisation des produits considérés, dans les conditions habituelles d'emploi, après prélèvements pour analyse.		
		Réduisant le danger	sans action sur le danger	Pouvant entraîner une augmentation du danger
Population "normale"	Modéré, direct, de diffusion potentiellement étendue	Cas 10	Cas 11	Cas 12
		$m \leq 100 / g$	$\leq 100 / g$	$\leq 100 / g$
		$n = 5$	$n = 10$	$n = 20$
		$c = 0$	$c = 0$	$c = 0$
Population à haut risque	Sévère direct	Cas 13	Cas 14	Cas 15
		$m = 0 *$	$m = 0 *$	$m = 0 *$
		$n = 5$	$n = 30$	$n = 60$
		$c = 0$	$c = 0$	$c = 0$

* unité analytique de 25 g

Tableau : III *Listeria monocytogenes*. Cas et plans d'échantillonnage proposés pour la vérification. (D'après ICMSF 1986 rapporté par JOUVE 1994).

m : critère

n : nombre d'échantillons analysés

c : nombre d'échantillons pour lequel un dépassement de m est toléré.

	Produits concernés	Seuil sortie fabrication	Seuil à la consommation	Conclusions au stade de la consommation	
				Respect du seuil	Dépassement du seuil ^(c)
<i>Listeria monocytogenes</i>	1- Tout produit cru (sauf produit au lait cru)	OBJECTIF :	m = 100 / g ^(a) n = 5 c = 0	- Absence dans 25 g : satisfaisant - Inférieur à 100 / g (a) : à suivre	
	2- produit au lait cru	ABSENCE DANS 25 g (TOLERANCE POSSIBLE DANS LA	m = 100 / g ^(a) M = 1000 / g ^(b) n = 5 c = 1	- Absence dans 25 g : satisfaisant - Inférieur à 100 / g (a) : à suivre - entre 100 et 1000 / g : à surveiller	IMPROPRE
	3- Aliments ayant subi un traitement	MESURE OU LE CRITERE A LA CONSOMMATION	m = 100 / g ^(a) n = 5 c = 0	- Abs dans 25 g : satisfaisant - Inférieur à 100 / g (a) : à suivre	A LA
	4- Aliments ayant subi un traitement d'assainissement dans son emballage	EST RESPECTE)	Absence dans 25 g (m = 0, n = 5, c = 0)	Satisfaisant	CONSOMMATION
<i>Listeria monocytogenes</i> Lysovar impliqué dans un épisode épidémique en cours	5- Tout produit	Absence dans 25 g	Absence dans 25 g	Satisfaisant	EN L'ETAT

Tableau IV : Seuils et conclusions relatifs à la contamination des aliments par *L. monocytogenes* (DGCCRF note de Service N° 6010 du 11/01/1994) .

(a) : Prendre en compte les incertitudes liées à la méthodologie analytique.

(b) : critère provisoire.

(c) : concerne aussi les résultats " Présence dans 25 g " pour les catégories 4 et 5.

Le contrôle de la qualité des produits de la mer peut être effectué par des analyses sensorielles généralement difficiles à mettre en oeuvre, ne concernant que l'état de fraîcheur. Les méthodes chimiques comme le dosage de l' ABVT (Azote Basique Volatil Total) permettent d'apprécier les altérations d'origine microbienne. Ces amines résultent en effet du catabolisme des protéines et de la réduction de l'oxyde de triméthylamine (TMAO) en triméthylamine (TMA) assurée par les micro-organismes. Cependant l'analyse microbiologique des produits reste le critère essentiel pour l'évaluation de la qualité et la distinction entre microflore d'altération et les bactéries pathogènes.

II. 1. 1. Microbiologie des produits de la mer.

La microbiologie du milieu aquatique va conditionner de façon importante celle des poissons. La flore bactérienne détectée dans les poissons est voisine de celle identifiée dans les eaux. Elle dépend de la zone de pêche, de la température, mais aussi de la salinité (SAINCLIVIER 1983). Les micro-organismes de poissons provenant d'eaux froides sont généralement psychrotrophes alors que bactéries provenant de poissons tropicaux sont mésophiles. Les bactéries mises en évidence dans le mucus recouvrant les poissons appartiennent au genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Sarcina*, *Serratia*, *Vibrio* et *Bacillus* (FRAZIER et WESTHOFF 1978, HOBBS et HODGKISS 1982). En plus des genres cités précédemment les genres *Aeromonas*, *Lactobacillus*, *Brevibacterium* et *Streptococcus* sont détectés chez les poissons d'eaux douces.

L'évolution de l'animal dans son milieu naturel permet aux micro-organismes de s'adsorber sur la peau mais aussi d'envahir les branchies et le tractus intestinal. Au niveau des intestins les bactéries des genres suivants peuvent être détectées : *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Clostridium* et *Escherichia*.

Le nombre de bactéries a été évalué de l'ordre de 100 à plusieurs millions de bactéries / cm² dans le mucus recouvrant le poisson, de 10³ à 10⁶ bactéries / g au niveau des branchies et de 10³ à 10⁸ bactéries / ml au niveau du contenu intestinal.

II. 1. 2. Contamination des produits de la mer et procédés de transformation de la matière première.

Les premiers changements survenant après la mort du poisson résultent de l'action d'enzymes tissulaires et digestives permettant aux bactéries d'envahir le muscle, jusque là stérile, à partir des branchies, de la peau et des intestins. Les produits de dégradations enzymatiques fournissent les premiers substrats (acides aminés, amines, glucose) à la flore d'altération et pathogène. Celle-ci produit alors de la triméthylamine, de l'ammoniaque, des amines des aldéhydes éventuellement des sulfites, de l'indole indiquant la putréfaction. La contamination après autolyse peut être limitée par une éviscération propre et rapide.

Pour restreindre le risque de contamination du produit et donc le risque d'altération, plusieurs méthodes peuvent être envisagées.

L'utilisation de la réfrigération permet de limiter l'oxydation des lipides et de diminuer les activités enzymatiques donc l'autolyse. Ce moyen simple à mettre en oeuvre restera cependant temporaire pour faire place à la congélation. En effet une simple réfrigération permet une prolifération des bactéries psychrotrophes comme *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* qui composent 80% de la flore bactérienne dans la dernière phase de la contamination (HOBBS et HODGKISS 1982). La congélation permet d'éliminer certains micro-organismes présents mais pas tous. Pour cette raison après décongélation la flore détectée sur les poissons est représentée par des bactéries psychrotrophes comme *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* et des spores de *Clostridium botulinum* (FRAZIER et WESTHOFF 1978).

L'utilisation du salage est une technique très répandue qui aboutit à la prévention de l'altération par réduction de l' a_w du produit. La flore normale de contamination des poissons essentiellement Gram négative est remplacée par une flore halophile et halotolérante appartenant aux genres *Micrococcus*, *Bacillus* et *Sarcina*. Des levures, des moisissures et des bactéries lactiques peuvent également se développer alors que *Flavobacterium*, *Alcaligenes* et *Pseudomonas* ont tendance à décroître (HOBBS et HODGKISS 1982).

Une technique très ancienne et traditionnelle de conservation combine salage et fumage. Aujourd'hui, cette technique permet la production de denrées ayant des caractéristiques particulières ; apparence, odeur et flaveur, aboutissant à une grande variété de produits. Le salage, souvent réalisé avec de la saumure, consiste à ajouter du chlorure de sodium au tissu, dans un but de conservation ou d'obtention d'une surface brillante après fumage. Les facteurs les plus importants dans cette étape sont : la taille du poisson, l'uniformité de sa forme, le taux de matière grasse pour les poissons gras et surtout la concentration de la saumure. Pour obtenir une concentration moyenne de 2 à 4 % en sel, le saumurage s'effectue entre 5 à 20 minutes dans une saumure saturée à 70-80 % en NaCl (CUTTING et SPENCER 1968).

Deux techniques de fumage sont à considérer : fumage à chaud (truite), fumage à froid (saumon fumé).

Le fumage à chaud est réalisé dans des fours à une température de l'ordre de 90-95°C induisant une température à coeur de l'ordre de 60°C. Dans ce cas le poisson est cuit.

Le fumage à froid est effectué à une température n'excédant pas 30°C et le poisson n'est pas cuit. Dans ce procédé, deux étapes ont lieu : la dessiccation donnant une texture particulière et l'addition de constituants de la fumée apportant les saveurs au produit (FRAZIER et WESTHOFF 1978).

D'une manière générale, les bactéries Gram négatif sont plus sensibles au sel, à la dessiccation et aux composés de la fumée que les bactéries Gram positif. Dans le cas d'un produit faiblement salé, les bactéries Gram négatif surmontent l'effet inhibiteur du sel et se développent au cours du

stockage du produit. Par contre, dans un produit plus fortement salé, les bactéries à Gram négatif sont tuées pour faire place à une flore Gram positif (HOBBS et HODGKISS 1982).

Dans le cas du saumon fumé au stade de la Date Limite de Consommation (DLC), CIVERA *et al.* (1995) ont montré que les bactéries liées à l'altération du produit sont :

dans 70 % des échantillons : des *Enterococci* ($2 \cdot 10^4$ à 10^7 UFC / g),

dans 50% des échantillons : des coliformes fécaux ($5 \cdot 10^3$ à $5 \cdot 10^5$ UFC / g),

dans 50 % des échantillons : des *Pseudomonas* ($2 \cdot 10^4$ à $3 \cdot 10^6$ UFC / g).

Les moisissures font également partie de cette flore de contamination (FRAZIER et WESTHOFF 1978) et dans les produits conditionnés les cocci Gram positif sont prédominants.

En fin de stockage, la flore prédominante des saumons à faibles aw (0,93-0,96) est constituée de *Streptococci* et *Lactobacilli*, alors que pour les saumons à plus forte aw (> 0,96) seuls les *Lactobacilli* sont rencontrés (SHIMASAKI *et al.* 1994).

Récemment, un nouveau genre bactérien, *Listeria*, a été mis en évidence dans la flore de contamination des produits de la mer notamment dans les poissons fumés.

II. 1. 3. Mise en évidence d'un nouveau genre bactérien contaminant les produits de la mer.

L. monocytogenes, responsable de cas sporadiques ou d'épidémies de listériose, a surtout été recherchée dans différentes catégories d'aliments comme le lait cru, les fromages, les végétaux, les produits carnés, souvent impliqués dans la transmission de la bactérie. Par sécurité, la détection de *Listeria* s'est étendue depuis peu aux produits de la mer (HARRISON *et al.* 1991, FUCHS et REILLY 1992, BEN EMBAREK 1994, DILLON *et al.* 1994).

II. 1. 3. 1. Recherche des *Listeria* dans les produits de la mer.

En 1957, *Listeria monocytogenes* a été mise en évidence dans les viscères de truites d'élevage en Roumanie, puis en 1959 dans des crustacés pêchés dans un fleuve russe.

Au printemps 1987, le risque potentiel de contamination des produits de la mer a été réellement pris en compte à la suite d'isolements de *L. monocytogenes* de crabes congelés, provenant du Mexique. Ce résultat confirmé par les bureaux de la FDA de Baltimore, est le premier événement qui conduira les USA à mettre en place des études officielles et à la recherche systématique de *Listeria* dans les crabes congelés importés du Mexique. Dans le même temps, la découverte de *Listeria* dans des crevettes crues venant de différents pays a entraîné l'élargissement de la recherche de *Listeria*, dans le cadre du "General Pathogen Surveillance Program" (octobre 1987), à d'autres produits de la mer comme le homard, le saumon fumé, la truite (RYSER et MARTH 1991d).

II. 1. 3. 2. Incidence de *Listeria* dans les différentes catégories de produits de la mer.

Les Etats Unis sont apparus comme "leader" dans la détermination de l'incidence de *Listeria* dans les produits de la mer. Depuis 1987, la communauté scientifique a multiplié les études portant sur *Listeria* dans les produits de la mer. Ces produits peuvent être regroupés en différentes catégories :

- . produits frais,
- . produits congelés,
- . produits séchés,
- . produits acides,
- . produits fumés.

Les études sur l'incidence de *Listeria* dans les produits frais sont peu nombreuses. En effet, qu'il s'agisse de poissons ou de fruits de mer, cette matière première est fragile et pour la conserver elle est souvent congelée ou transformée rapidement. Une étude réalisée par FUCHS et SURENDRAN (1989), sur des poissons et des fruits de mer originaires du sud de l'Inde, a révélé 30 % de prélèvements contaminés en *L. innocua*.

HARTEMINK et GEORGSSON (1991) révèlent un taux de contamination de l'ordre de 56 % pour les poissons islandais.

Dans la catégorie des produits congelés, les fruits de mer notamment les crevettes et les crabes, ont été largement étudiés puisqu'ils sont à l'origine des contrôles instaurés sur les produits de la mer. WEAGENT *et al.* (1988) ont montré que sur 57 échantillons analysés, 61 % sont positifs en *Listeria spp* dont 26 % en *L. monocytogenes*. La congélation étape occasionnant des lésions léthales et subléthales chez les micro-organismes, ne semble pas beaucoup affecter *Listeria*. Cette observation est en accord avec celles de PALUMBO et WILLIAMS (1991) qui ont démontré la résistance de *L. monocytogenes* congelée dans des aliments (différentes viandes, glaces, soupe de tomate...) ayant un pH supérieur à 5,8.

Dans les poissons séchés, d'origine islandaise (HARTEMINK et GEORGSSON 1991) ou d'origine indienne (FUSCH et SURENDRAN 1989), la présence de *Listeria* n'est pas décelée. Dans le premier cas, aucun détail n'est fourni quant à la méthode de séchage et aux critères du produit fini. Pour les échantillons d'origine indienne, le poisson est salé puis séché au soleil. L'exposition à l'environnement extérieur pendant le séchage constitue un risque de contamination en *Listeria* mais les conditions de croissance rencontrées dans le produit fini (humidité : 20 à 25 %, taux en NaCl : 15 à 20 %) ne semblent pas favorables.

Ces auteurs se sont également intéressés aux produits de la mer dits "acides". Sur des marinades de poisson provenant d'un supermarché de Lima (Perou), FUCHS et SIRVAS (1991) ont décelé 75 % d'échantillons positifs en *Listeria* malgré un pH dans le produit fini variant de 3,8 à 4,8. L'espèce majoritaire détectée est *L. innocua*.

Le pH de salades de poisson islandais analysées par HARTEMINK et GEORGSSON (1991) est compris entre 4,53 et 6,25. Trente deux % des échantillons sont positifs en *Listeria spp* avec 16 % en *L. monocytogenes*.

Ces résultats obtenus pour des produits de la mer dits "acides" montrent que même un pH acide de l'ordre de 3,8 n'est pas suffisant pour inhiber *Listeria*.

La catégorie des poissons fumés a été étudiée par plusieurs auteurs. L'analyse de poissons islandais (HARTEMINK et GEORGSSON 1991) a mis en évidence 29 % d'échantillons positifs en *Listeria spp*. Le support de cette étude est constitué de différents types de poissons fumés :

- . saumon fumé : 13 % positifs en *Listeria spp*
- . saumon tranché : 40 % positifs en *Listeria spp*
- . hareng: 20 % positifs en *Listeria spp*
- . truite: 50 % positifs en *Listeria spp*.

FARBER (1991) s'est intéressé aux taux de contamination de saumons fumés de différentes provenances. *L. monocytogenes* a été retrouvée dans :

- . 50 % des saumons provenant des USA,
- . 50 % des saumons provenant du Chili,
- . 0 % des saumons provenant d'Ecosse,
- . 50 % des saumons provenant de Norvège,
- . 25 % des saumons provenant du Canada.

En 1993 JEMMI met en évidence 107 échantillons positifs en *Listeria monocytogenes* sur 1125 échantillons analysés (soit 9,5%). Les produits fumés à chaud représentent 8,4% contre 11,3% pour les échantillons fumés à froid.

L'ensemble de ces études indique une incidence de *L. monocytogenes* comprise entre 10 et 50% des produits fumés.

Ces études sur l' incidence de *Listeria* dans les produits de mer soulignent le risque potentiel de ces produits pour la santé publique. A ce jour, un seul cas officiel de listériose lié à la consommation d'un produit de la mer a été rapporté. En 1989, une italienne âgée de 54 ans a contracté une méningite après avoir mangé un poisson insuffisamment cuit, dans lequel *L. monocytogenes* sérotype 4b a pu être isolée (RYSER et MARTH 1991 d).

Cependant, d'autres cas de listériose, dont l'origine est vraisemblablement liée à la consommation de poisson cru ont été rapportés en Nouvelle Zélande (LENNON *et al.* 1984).

Depuis 1987, la FDA suivant sa politique de "zéro tolérance" vis à vis de *L. monocytogenes* dans les produits alimentaires cuisinés ou "ready to eat", a déjà saisi plusieurs lots de produits de la mer contaminés en *Listeria* (cf Tableau V).

II. 2. SAUMON FUME ET *LISTERIA*.

L'intérêt porté au problème de *Listeria* dans le saumon fumé se justifie par l'importance économique de ce produit (forte valeur ajoutée), par son statut "d'aliment à risque" et par une incidence élevée en *L. monocytogenes*.

II. 2. 1. Appellation saumon fumé et diagramme de fabrication.

Le produit "saumon fumé" doit répondre depuis peu à une codification établie par les pouvoirs publics, les producteurs et représentants de la filière. Celle-ci reprise dans la norme AFNOR NF V 45-065 définit les dénominations de vente appropriées en spécifiant les caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du saumon fumé.

L'appellation saumon fumé est réservée aux produits préparés à partir des espèces suivantes : *Salmo salar* L (Saumon atlantique), *Oncorhynchus kisutch* L (Saumon argenté du Pacifique) et *Oncorhynchus tshawytscha* L (saumon royal du Pacifique).

Les caractéristiques physico-chimiques du produit fini concernent : l'humidité (< 74%), la matière grasse libre (<18%), le taux de sel (2,5 à 3,5 % NaCl), et le taux de phénols totaux (≥ 1 mg / 100g).

Les critères microbiologiques à respecter sont repris dans le Tableau VI.

Flores recherchées	Maximum acceptable en fin de durée de vie Tests de validation de la DLC
Micro-organismes d'altération (indicateurs d'hygiène)	
Microorganismes aérobies 30°C	10^6 / g
Micro-organismes pathogènes ou témoins de contamination fécale	
Coliformes thermotolérants (44,5°C) : <i>E. coli</i>	1 / g
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^2 / g
Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)	10 / g
<i>Salmonella</i>	absence / 25 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	10^2 / g

Tableau VI : Critères microbiologiques pour le saumon fumé norme AFNOR NF V 45-065.

Product	Date recall initiated	Origin of manufacture	Distribution	Quantity (lb)
Fresh frozen cooked crabmeat	5/28/87	Mexico	California, Pennsylvania Texas, Virginia	7,500
Cooked, peeled shrimp	11/4/87	Florida	Florida, Illinois	79
Fresh crabmeat	11/2/87	Texas	Maryland, Pennsylvania Washington, DC	700
Frozen crabmeat	6/10/88	Oregon	California, Washington	1,685
Frozen cooked shrimp	8/1/88	New York	New York	1,230
Frozen lobster meat	8/26/88	canada	Maine, Massachusetts	264
Cooked, peeled shrimp	9/16/88	Washington	Washington	6,830
Smoked Nova Scotia salmon	12/1/88	Washington	Massachusetts, New York	12,000- 15,000
Imitation crabmeat	12/9/88	japan	Colorado, Michigan, Washington	Unknown
Fresh crabmeat	4/10/89	Mexico	Maryland, Washington, DC	Unknown
Nova lox	4/14/89	California	Massachusetts	11,640
Fresh crabmeat	8/8/89	Texas	Maryland, texas	Unknown
Smoked salmon	8/14/89	Washington	California, Washington	132
Smoked salmon products	9/29/89	Illinois	Nationwide	6,975
Smoked cod and trout	11/10/89	Maryland	Ohio, Maryland, Virginia, Washington, DC	Unknown

Tableau V : Liste chronologique des produits de la mer, contaminés en *Listeria monocytogenes*, retirés de la vente aux USA.

Le procédé de transformation du saumon en saumon fumé est basé sur trois traitements essentiels : salage, séchage et fumage. Le diagramme de fabrication des poissons fumés publié par JOUVE (1993 c) reprend les différentes étapes intervenant dans l'obtention du produit fini (Fig 1).

II. 2. 2. L'origine de la contamination en *Listeria*

Le nombre important des manipulations mécaniques ou manuelles présentes au cours du procédé de transformation constitue à lui seul un risque élevé de contamination du produit. Mais la première source de contamination en *Listeria* du saumon fumé est le saumon lui-même. En effet, *Listeria* est considérée comme un contaminant de l'environnement et peut être trouvée dans l'eau. COLBURN *et al.* 1990 rapportent que 81 % des échantillons d'eau douce et 33% des échantillons d'eau de mer sont positifs en *Listeria* et sur l'ensemble des ces échantillons 62 % sont positifs en *L. monocytogenes*. La présence de *Listeria* dans l'environnement marin n'est pas surprenante puisque cette bactérie est très tolérante vis à vis du sel (SHAHAMAT *et al.* 1980, HEFNAWY et MARTH 1993). *Listeria* est isolée dans les eaux usées au niveau des égouts, dans les effluents d'unités de transformation et dans les effluents de traitement des eaux (MOTES 1991). DILLON et PATEL (1992) présentent un schéma possible de contamination en *Listeria*, supposant une contamination initiale du poisson par son élément environnant : l'eau.

Des essais de contamination en *L. innocua*, d'un élevage de saumons, par l'intermédiaire de la nourriture ont montré que cette bactérie n'est pas capable de coloniser la surface de la peau. Par contre elle a été retrouvée dans les viscères 96 heures après ingestion, indiquant la possibilité pour *Listeria* de survivre dans le tractus intestinal (BREMER et COOKE 1993). La localisation de *Listeria* au niveau intestinal souligne l'importance de l'éviscération qui doit être réalisée rapidement pour stopper l'action digestive des enzymes (FRAZIER et WESTHOFF 1978). Elle peut constituer un risque de contamination croisée si elle est mal réalisée (LEUNG *et al.* 1992).

Pendant longtemps, la matière première a été considérée comme cause principale de contamination du produit. JOUVE (1993 c) rapporte un taux de contamination en *Listeria* de la matière première de l'ordre de 30 % des échantillons.

L'étude de trois sites de production de poissons fumés, situés en Suisse, a mis en évidence un taux de contamination important du poisson cru (28,6% *L. monocytogenes*), alors que le produit fini était moins contaminé (6,3 % *L. monocytogenes*) (GUYER et JEMMI 1990). Les travaux de RORVIK *et al.* (1995) confirment cette remarque mais soulignent l'augmentation de la contamination au cours du procédé de transformation notamment après filetage, pour retrouver un taux de contamination plus faible dans le produit fini. Ces travaux ont également permis de montrer par analyse des profils d'isoenzymes des souches isolées que la source de contamination du produit fini provient essentiellement de l'atelier de transformation et non de "l'abattoir".

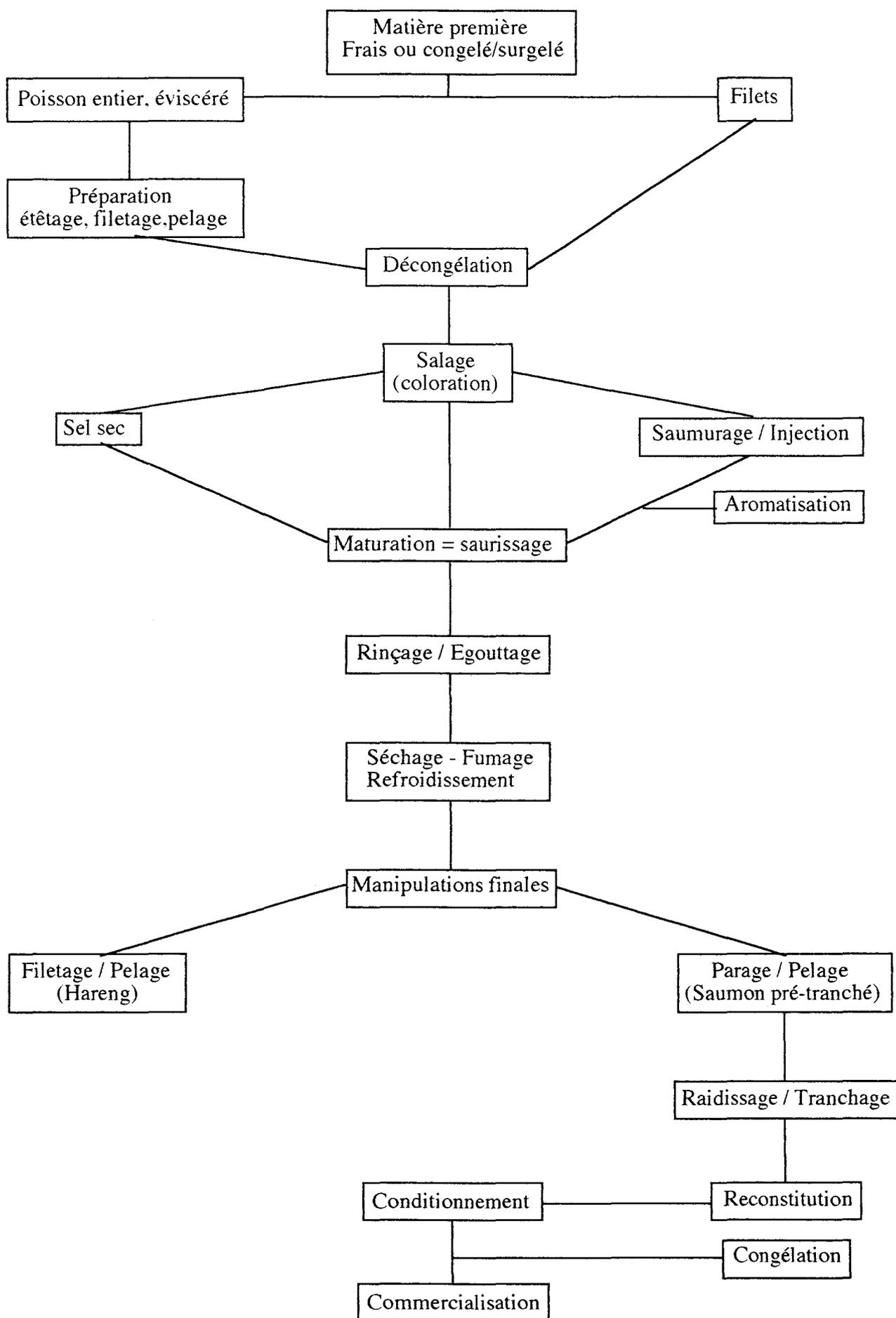


Fig 1 : Diagramme de fabrication des poissons fumés . (JOUVE 1993).

En effet, la souche retrouvée est largement répandue dans les prélèvements d'environnement de l'atelier de transformation qui semble donc jouer le rôle de réservoir en *L. monocytogenes*. Cependant, aucune voie de contamination n'a pu être clairement identifiée.

Si l'origine de la contamination est peu connue, sa répartition au sein d'ateliers de production ; produits laitiers et carnés, est en revanche bien déterminée.(SLADE 1992). Ainsi , *Listeria* est retrouvée avec une fréquence décroissante au niveau : des drains, des sols, des déchets et des surfaces en contact avec l'aliment. De plus, l'incidence de *Listeria* est bien corrélée avec les endroits humides, notamment les convoyeurs, les sols, et les drains. *Listeria* a la possibilité de s'établir dans toute niche écologique où l' a_w est suffisamment élevée (approximativement 0,93) (SKOVGAARD 1989).

La contamination du produit au cours du procédé de transformation constitue un problème important, mais peut être atténuée par une sélection des matières premières en fonction des conditions d'élevage (JEMMI et KEUSCH 1994), une application de plans de nettoyage désinfection adéquats et surtout par le respect des bonnes pratiques d'hygiène. L'ensemble des mesures spécifiques à adopter au cours de la production et du stockage des poissons fumés a été énoncé par JEMMI (1993).

II. 2. 3. Comportement de *Listeria* dans le produit fini.

Le problème majeur de la présence de *Listeria* dans les saumons fumés reste sa capacité à se développer dans le produit fini. Les poissons fumés constituent une catégorie intéressante par les étapes du procédé de transformation. En effet, le salage et le fumage pourraient être déterminants quant à la qualité bactériologique du produit fini. Une étude du comportement de *L. monocytogenes* pendant la fabrication et le stockage du saumon fumé a été réalisée par GUYER et JEMMI (1991). Pendant le procédé, la concentration en *Listeria* est restée équivalente. Les paramètres technologiques du salage et du fumage, et une congélation ne semblent pas affecter *L. monocytogenes* . En outre le stockage à 4 et 10°C permet le développement de *L. monocytogenes* . En effet, avec un taux initial de contamination de 2,5 log et 4,5 log la population en *Listeria* atteint environ 10^7 UFC / g après 30 jours de stockage à 4 ou 10°C.

Ce résultat a été confirmé par différentes équipes ayant réalisé des inoculations artificielles de *Listeria* dans le produit fini, simulant une contamination après transformation Tableau VII.

Le fumage à froid (26 à 30°C) n'inhibe pas *Listeria* (DILLON et PATEL 1993). Par contre un fumage haute température (65°C, 35 minutes) semble détruire *Listeria* ; celle-ci n'est plus détectée lors d'un suivi dans le produit (KEUSCH et JEMMI 1992).

L'étude de JEMMI (1993) apporte des renseignements sur la répartition des sérotypes de *L. monocytogenes* dans des poissons fumés à froid ou à chaud. La prédominance des sérotypes : 1/2 a, 1/2b et 4b (avec par ordre croissant de fréquence : 1/2 b > 1/2 a > 4b) souligne le risque

Produits	Souche <i>L. monocytogenes</i>	Taux d'inoculation UFC / g (log 10)	Température de stockage	Évolution de la population <i>Listeria</i>	Références Bibliographiques
Saumon fumé	Scott A (4b)	2	4°C	+ 2,5 log en 15 Jours	FARBER 1991
Saumon fumé	HPB 323	2	4°C	+ 2 log en 15 Jours	FARBER 1991
Saumon fumé	culture mixe : NCTC 7973 + 2 souches (isolées du saumon)	0,7	4°C	+ 5 log en 28 Jours	RORVIK <i>et al.</i> 1991
Saumon fumé	culture mixe : NCTC 7973 + 2 souches (isolées du saumon)	2,7	4°C	+ 4 log en 28 Jours	RORVIK <i>et al.</i> 1991
Saumon fumé	NCTC 7973+ souche (isolée de moule)	4,4	5°C	+ 4,5 log 28 Jours (en aérobie)	HUDSON 1993
Saumon fumé	NCTC 7973+ souche(isolée de moule)	4,4	5°C	+ 3,6 log en 28 Jours (sous vide)	HUDSON 1993
Saumon fumé	NCTC 7973+ souche (isolée de moule)	4,4	10°C	+ 3 log en 5 Jours (aérobie)	HUDSON 1993
Saumon fumé	NCTC 7973+ souche (isolée de moule)	4,4	10°C	+ 3,4 log en 5 Jours (sous vide)	HUDSON 1993

Tableau VII : Evolution de la population *Listeria* dans des produits de la mer contaminés artificiellement.

potentiel de ces produits pour la santé publique. En effet, ces trois sérotypes sont responsables approximativement de 90% des cas de listériose humaine. Le sérotype 4b, plus rarement détecté dans les aliments, est isolé plus spécifiquement des produits fumés à froid, où *L. monocytogenes* est présente dans 26 % des échantillons analysés. Le profil d'isoenzymes de ces souches est différent de celui déterminé pour les souches responsables d'épidémie en Amérique du nord ou en Suisse.

III. METHODES UTILISEES DANS LA RECHERCHE DES LISTERIA

III. 1. METHODES TRADITIONNELLES.

III. 1. 1. Etapes d'enrichissement : historique.

Les difficultés rencontrées pour l'isolement de *L. monocytogenes* remontent à la première caractérisation de ce pathogène en 1926 par MURRAY *et al.* L'isolement est fortement compromis quand *Listeria* existe en faible nombre dans les échantillons d'origine alimentaire et environnementale et une étape d'enrichissement est généralement nécessaire.

En 1948 GRAY *et al.* ont introduit une procédure d'enrichissement à froid pour isoler *L. monocytogenes* de cervelle de bovin. Cette méthode implique un stockage de l'échantillon dilué dans un bouillon Tryptose de 5 à 13 semaines à 4 °C. Un isolement hebdomadaire est réalisé sur un milieu non sélectif : le Tryptose agar.

Cet enrichissement à froid exploite simultanément le caractère psychrophile de *L. monocytogenes* et l'absence de croissance des micro-organismes indigènes non psychrotrophes. L'incubation à 4°C favorise la croissance de *L. monocytogenes*, mais d'autres bactéries comme *Proteus*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* et certaines bactéries lactiques sont également capables de se multiplier dans un milieu non sélectif à la température de réfrigération.

Bien que cette méthode d'enrichissement à froid ait contribué aux connaissances actuelles sur *Listeria*, l'importance du temps d'incubation est un handicap. De nouvelles méthodes faisant appel à un enrichissement à la température de 30°C ont été développées. Pour augmenter le taux de recouvrement de *Listeria* un enrichissement primaire suivi d'un enrichissement secondaire peut être pratiqué.

Le principe de l'enrichissement à 30°C est basé sur l'inhibition sélective de la flore indigène de l'échantillon par l'addition d'agents sélectifs, tout en permettant le développement de *Listeria*.

III.1. 2. Les agents sélectifs utilisés pour l'enrichissement.

Pour prévenir le développement de micro-organismes autres que *Listeria*, divers agents sélectifs ou antibiotiques ont été ajoutés aux bouillons d'enrichissement en tirant parti de la résistance de *Listeria* à ces agents.

Plus de 40 formulations différentes de bouillons d'enrichissement ont été étudiées pour la recherche de *L. monocytogenes* d'aliments contaminés artificiellement ou naturellement, d'échantillons cliniques ou de l'environnement (RYSER et MARTH 1991 a).

Les mêmes agents sélectifs ajoutés aux milieux de base (ex : bouillon Tryptose, bouillon Tryptose phosphate, Oxoïd nutrient broth 2...) sont retrouvés pour les enrichissements "à chaud" ou "à froid".

En 1950, GRAY *et al.* ont mis en évidence l'effet sélectif du tellurite de potassium dans un bouillon Tryptose. Par la suite, d'autres chercheurs ont montré l'inhibition de certaines souches de *L. monocytogenes* par cet agent. Le même phénomène a été rencontré avec le thiocyanate de potassium.

Mc BRIDE et GIRARD (1960) ont réussi à favoriser la croissance de *Listeria monocytogenes* en présence de bacilles Gram négatif par l'emploi de la combinaison de phényléthanol et de chlorure de lithium.

BEERENS et TAHON-CASTEL (1966) ont été les premiers à rapporter l'intérêt de l'acide nalidixique comme agent sélectif pour l'isolement de *L. monocytogenes*. L'acide nalidixique inhibe essentiellement les bactéries Gram négatif, cependant certaines souches résistantes à cet antibiotique (*Pseudomonas*, *Proteus* et quelques cocci Gram positif) peuvent se développer. L'acide nalidixique reconnu comme l'un des antibiotiques le plus important est souvent intégré dans des combinaisons faisant intervenir plusieurs agents. Ainsi additionné à la trypaflavine, il permet d'éliminer la croissance des cocci gram positif mais affecte légèrement la croissance de *L. monocytogenes*.

En 1972 SEELIGER a montré que la combinaison : acide nalidixique, acriflavine était plus appropriée, supprimant les bactéries Gram négatif et les Streptocoques fécaux sans affecter le recouvrement de *L. monocytogenes*.

Ces dernières années, nombre de milieux contenant un mélange d'acide nalidixique et acriflavine, seul ou avec d'autres agents, ont été proposés pour l'enrichissement ou l'isolement de *L. monocytogenes* (Fraser, University of Vermont Medium (UVM), FDA enrichment broth...).

En 1972 BOJSEN-MOLLER a montré que l'addition de polymyxine B au bouillon tryptose phosphate réduit la population des bacilles Gram négatif incluant *Escherichia coli*,

Pseudomonas, *Proteus* ainsi que la population des *Enterococcus* et permet une croissance rapide de *Listeria*. Cet agent sélectif a été utilisé seul ou couplé à l'acide nalidixique ou à un mélange acide nalidixique-acriflavine (RODRIGUEZ *et al.* 1984). Cette dernière combinaison, permettant l'inhibition de la croissance de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*, s'est révélée particulièrement appropriée dans l'isolement de *Listeria* des produits laitiers.

D'autres agents inhibiteurs comme l'acridine, le cycloheximide, la ceftazidime, le moxalactam permettent d'augmenter le recouvrement de *L. monocytogenes* à partir d'échantillons contenant une flore microbienne très diverse.

III. 1. 3. Milieux d'isolement.

Une fois l'enrichissement de l'échantillon réalisé, *Listeria* doit être isolée sur gélose. Les premiers milieux utilisés étaient des géloses non sélectives couramment employées en bactériologie classique (Tryptose Agar, Blood Agar, ou de Brain Heart Infusion Agar). La non sélectivité de ces milieux rendait difficile voire impossible l'isolement de *Listeria* dans le cas d'échantillons polymicrobiens. Pour augmenter la sélectivités des géloses, diverses formulations ont été étudiées. Plus de 70 milieux sélectifs ont été décrits pour la détection de *Listeria* dans des échantillons de l'environnement, cliniques ou alimentaires (RYSER et MARTH 1991 a).

Les agents sélectifs utilisés dans les bouillons d'enrichissement ont été également employés dans l'établissement des compositions des géloses d'isolement : acide nalidixique, tryptaflavine, acriflavine, phényléthanol, chlorure de lithium, acridine, cycloheximide, moxalactam, ceftazidime, polymyxine B.

Le Mc Bride *Listeria* Agar (MLA) introduit en 1960 par Mc BRIDE et GIRARD a été une des premières géloses la plus appropriée pour l'isolement de *Listeria* à partir de culture polymicrobienne. Celui-ci est préparé à partir du Phényléthanol Agar contenant du sang de mouton, de la glycine et du chlorure de lithium. Ce milieu a subi plusieurs modifications avec la suppression du sang de mouton et la substitution de la glycine par de la glycine anhydre moins inhibitrice pour *Listeria* (Modified Mc Bride *Listeria* Agar : MMLA).

Le MMLA modifié en 1987 par LOVETT *et al.* par l'addition de cycloheximide a été utilisé dans la procédure de recherche de *Listeria* préconisée par la FDA (Food and Drug Administration) et est plus connu sous le nom de FDA-MMLA.

LEE et Mc CLAIN (1986) ont également utilisé la base du Mc Bride *Listeria* Agar (contenant 0,25% phényléthanol et 0,5% LiCl) à laquelle ils ont ajouté 20 mg de moxalactam : un antibiotique inhibant les bactéries Gram positif *Staphylococcus* et Gram négatif (*Proteus* et *Pseudomonas*). Ce milieu répertorié sous le nom de Lithium chloride Phényléthanol Moxalactam Agar (LPM Agar) est particulièrement adapté pour l'isolement de *Listeria* de viandes crues et de

volailles. Le LPM agar a été le milieu recommandé dans le premier protocole de recherche des *Listeria* défini par l'USDA (United States Department of Agriculture). Il a été également employé dans la procédure FDA en 1988 comme deuxième gélose sélective.

En plus du développement de la sélectivité des géloses d'isolement de *Listeria*, des systèmes indicateurs ont été introduits pour un repérage plus rapide des colonies suspectes.

Un des premiers éléments permettant la caractérisation de *L. monocytogenes* est l'incorporation de sang au milieu d'isolement. Les colonies de *L. monocytogenes* sont entourées d'une zone d'hémolyse. Cette hémolyse B n'étant pas toujours franche rend difficile la détection des

L. monocytogenes. De plus certaines espèces de *Listeria* ne possédant pas ce facteur d'hémolyse ne sont pas mises en évidence.

Plus récemment, COX *et al.* (1991a,b) ont réactualisé cet indicateur sang complété d'un facteur facilitant l'hémolyse (la sphingomyelinase) et d'un substrat (4-méthylumbelliferyl- β -D-glucoside) fluorescent après hydrolyse. Ce milieu appelé Enhanced Haemolysis Agar (EHA) fortement sélectif permet la discrimination entre les colonies de *monocytogenes* et d'*innocua*, souches souvent associées dans les échantillons alimentaires.

Des milieux, contenant des agents autres que le sang, ont été développés pour aider le microbiologiste dans la détection des colonies de *Listeria* au sein d'une culture mixte.

La visualisation des colonies suspectes sur LPM, MLA, MMLA se fait par la technique de transillumination oblique HOT (Henry Oblique Transillumination) décrite par HENRY et modifiée par LACHICA (1990 a) : SHOT (Simplified HOT). La gélose examinée sous une lumière blanche transmise obliquement à travers le milieu, favorise la détection des colonies de *Listeria*. Celles-ci, rondes, petites apparaissent bleuâtres avec une texture granuleuse.

Les épidémies de listériose au début de la décennie 1980 ont incité les chercheurs à mettre au point des géloses sélectives où les colonies suspectes sont très caractéristiques.

En 1987 BUCHANAN *et al.*, sur la base du milieu Vogel Johnson Agar ont mis au point une gélose (MVJ) qui permet la croissance de *Listeria* tout en inhibant celle des micro-organismes couramment rencontrés dans les aliments notamment les *Micrococcus* et *Streptococcus*. Le MVJ renferme une combinaison d'agents sélectifs comprenant l'acide nalidixique, le moxalactam et la bacitracine. L'originalité de cette gélose est d'intégrer un système indicateur : le tellurite de potassium, rendant la détection des colonies de *Listeria* plus aisée. Celles-ci réduisent le tellurite de potassium et apparaissent noires sur un fond rouge

En 1984, RODRIGUEZ *et al.* introduisent un nouveau système indicateur dans la formulation des géloses pour l'isolement de *Listeria*. Le genre *Listeria* est capable d'hydrolyser l'esculine en esculetine. Ce composé de dégradation en présence d'ions ferriques donne un précipité noir.

Le milieu Oxford (OX) développé par CURTIS *et al.* en 1989 utilise ce système indicateur. Après 48 heures d'incubation les colonies typiques apparaissent luisantes, grises ou grises verdâtres entourées d'un halo noir, sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale. Les antibiotiques suivants : colistine, cefotetan et fosfomycine contenus dans le milieu Oxford ont été modifiés sur la proposition de LEE pour donner l'Oxford modifié (MOX), où seuls les antibiotiques, colistine et moxalactam, sont retrouvés.

VAN NETTEN *et al.* (1988) a également utilisé l'esculine couplée à du mannitol et du rouge de phénol dans la formulation du RAPAMY Agar (RALOVICH, Acriflavine, Phénylethanol, Aesculin, Mannitol et egg Yolk emulsion) et ALPAMY agar (Acriflavine, Lithium chloride, Phénylethanol, Aesculin, Mannitol et egg Yolk emulssion). *Listeria* hydrolyse l'esculine mais ne métabolise pas le mannitol. Les colonies typiques ont le même aspect que sur le milieu Oxford avec une couleur grise verte et sont entourées un halo noir sur un fond rouge. Ces deux géloses n'étant pas très satisfaisantes ont été optimisées par VAN NETTEN *et al.* (1989) pour donner naissance au PALCAM agar (Polymyxine, Acriflavine, Lithium chloride, Ceftazidime, Aesculin, Mannitol) plus sélectif, pouvant inhiber la plupart des *Enterococcus* sans inhiber *Listeria*. De plus, le double système indicateur facilite la différenciation des colonies de *Listeria* des éventuelles colonies d'*Enterococcus* et de *Staphylococcus* non inhibés.

III. 1. 4. Techniques d'identification des *Listeria*.

Parallèlement aux techniques rapides de détection, des méthodes d'identification des *Listeria*, plus rapides et plus faciles à mettre en oeuvre se sont développées.

En 1990 (b) LACHICA a proposé un schéma d'identification rapide des espèces de *Listeria*. Celui-ci est basé sur les critères biochimiques suivants :

- . le CAMP Test permettant d'évaluer l'existence d'un facteur hémolytique (cf Matériel et méthodes),
- . la fermentation d'oses comme le rhamnose et le xylose,
- . le test de la catalase,
- . la mobilité.

Ce schéma d'identification proposé par LACHICA restant très lourd à mettre en place a été remplacé par des galeries miniaturisées. La galerie Api 20 Strep a été employée pour la différenciation des *Listeria* B hémolytiques (*L monocytogenes*, *L seeligeri*, *L. ivanovii*) des *Listeria* non hémolytiques (*L innocua*, *L welshimeri*, *L grayi*, *L murrayi*). Cette galerie API 20 Strep développée à l'origine spécialement pour les *Streptococcus*, s'est révélée très utile pour l'identification de *Listeria*.

Aujourd'hui le microbiologiste dispose d'une galerie API spécifique du genre *Listeria* qui permet la différenciation des six espèces de *Listeria*.

Cette galerie API *Listeria* permet de tester dix caractères biochimiques :

- . l'hydrolyse de l'esculine,
- . α mannosidase,
- . l'acidification du D arabitol,
- . l'acidification du D xylose,
- . l'acidification du rhamnose,
- . l'acidification de l' α methyl - D - glucoside,
- . l'acidification du ribose,
- . l'acidification du glucose - 1 - phosphate,
- . l'acidification du tagatose,
- . différenciation *L innocua* et *L monocytogenes* par l'activité d'une arylamidase (LARPENT 1995).

La simplicité et la facilité d'utilisation fait de cette galerie miniaturisée un outil appréciable pour le microbiologiste.

Une méthode plus sophistiquée, largement employée en taxonomie, est l'identification des micro-organismes par l'intermédiaire de leur profil d'acides gras membranaires étudiés en chromatographie phase gazeuse (CPG). Cette méthode permet l'identification de bactéries inconnues à partir d'une culture pure (WELCH 1991, KANADA 1991) et a été utilisée chez *Listeria* (NINET *et al.* 1992).

L'analyse par CPG des acides gras membranaires, extraits d'un micro-organisme cultivé en conditions standardisées, permet d'obtenir un profil caractéristique de ce micro-organisme en répertoriant les différents acides gras et leur pourcentage dans l'extrait.

L'utilisation de la CPG couplée à un système informatique contenant une banque de données des profils d'acides gras de souches référencées a été développée. Connue sous le nom de Microbial Identification System (MIS), cette méthode permet une identification automatique de diverses souches en comparant leur profil à ceux de la banque de données.

De la standardisation des conditions de culture dépend la validité de l'identification, puisque un facteur telle que la température peut entraîner une variation du profil d'acides gras membranaires (JUNEJA *et al.* 1993, PUTTMANN *et al.* 1993).

Cette technique est très appréciée lors d'études d'écologie d'ateliers, la rendant plus rapide et moins fastidieuse.

III. 1. 5. Méthodes reconnues pour la détection des *Listeria*.

L'importance de la liste des bouillons d'enrichissement et des géloses pour l'isolement des *Listeria* confronte les microbiologistes au choix du milieu le plus adéquat pour la détection des *Listeria* dans un produit alimentaire particulier. Les épidémies de listériose recensées depuis 1980 ont conduit à une standardisation des méthodes de recherche du véhicule de *Listeria* dans les aliments.

Les USA par l'intermédiaire de la FDA et l'USDA ont préconisé deux méthodes de recherche de *Listeria* : l'une dans les produits carnés et l'autre pour divers produits alimentaires.

La méthode FDA développée à l'origine par LOVETT est fréquemment utilisée pour l'analyse du lait et des produits laitiers, des végétaux, et des échantillons d'environnement. La procédure originelle FDA employée de Juin 1985 à Octobre 1988 est rapportée Fig 2. Cette procédure a particulièrement réduit et simplifié l'isolement de *Listeria spp* comparée aux premières méthodes utilisant l'enrichissement à froid. En effet, de quelques semaines voire quelques mois, le délai d'une analyse passe à 10-11 jours pour l'isolement et la confirmation.

La comparaison du "FDA enrichment broth" et de l'UVM (USDA) a montré une concordance des résultats obtenus. Par contre la comparaison de différentes géloses d'isolement a mis en évidence la supériorité du LPM agar (USDA) sur le FDA-MMLA (LOESSNER *et al.* 1988).

Des études réalisées aux USA et au Canada ont révélé que l'incubation au delà de 48 heures ne permettait pas d'améliorer la détection de *Listeria* (RYSER et MARTH 1991 a).

En octobre 1988, la FDA a révisé la procédure de recherche des *Listeria*, introduisant une deuxième gélose sélective : le LPM et réduisant le temps d'incubation de l'enrichissement à 48 heures (Fig 3).

En 1990 une nouvelle modification intervient remplaçant le FDA-MMLA par une gélose plus performante : l'Oxford.

Une méthode basée sur la procédure FDA a été mise en place par l'International Dairy Federation (IDF) pour l'analyse du lait et des produits laitiers susceptibles de contenir des bactéries lésées par le procédé de transformation (Fig 4).

L'originalité de cette méthode est l'introduction d'un préenrichissement de 24 heures dans un bouillon non sélectif suivi d'une subculture dans un bouillon sélectif. Cette étape favorise une remise en état des cellules lésées mais aussi le maintien du pH proche de la neutralité au cours de l'incubation .

L'USDA, la deuxième agence fédérale américaine, chargée de contrôler la qualité microbiologique des viandes a également mis en oeuvre une procédure de recherche des *Listeria*. LEE et Mc CLAIN sont à l'origine de cette procédure employée de 1986 à Avril 1989 (Fig 5). L'introduction d'un enrichissement primaire de 24 heures suivi d'un enrichissement secondaire plus sélectif, constitue une différence très importante par rapport à la méthode FDA. Ce protocole utilisé à l'origine sur les produits carnés a également été testé sur des produits laitiers (brie, glace..) et s'est révélé plus performant que la procédure FDA.

Suite à la mise en évidence de cas de listériose associés à la consommation de viande et de volaille l'USDA a révisé la procédure en Mai 1989. Les modifications apportées concernent le remplacement du LEB II par le bouillon Fraser et du LPM par l'Oxford modifié (Fig 6).

Fig 2 : Procédure originale FDA pour l'isolement de *L. monocytogenes* d'aliments, Juin 1985 à Octobre 1988 (RYSER et MARTH 1991 a).

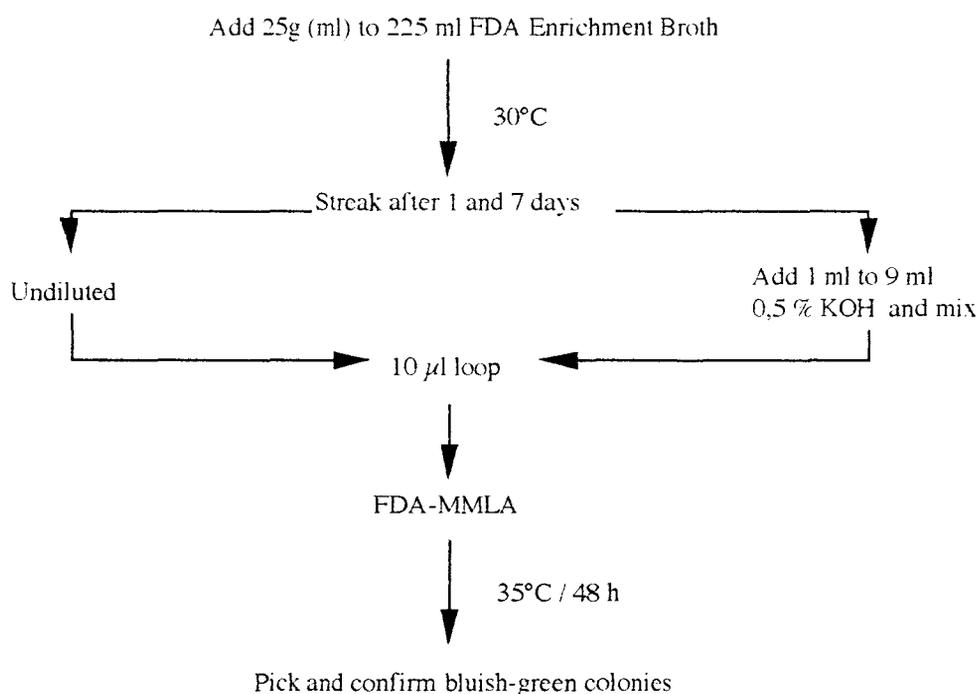


Fig 3 : Procédure FDA révisée pour l'isolement de *L. monocytogenes* d'aliments, Octobre 1988 jusque 1990 où le FDA-MMLA a été remplacé par l'OXFORD agar (RYSER et MARTH 1991a).

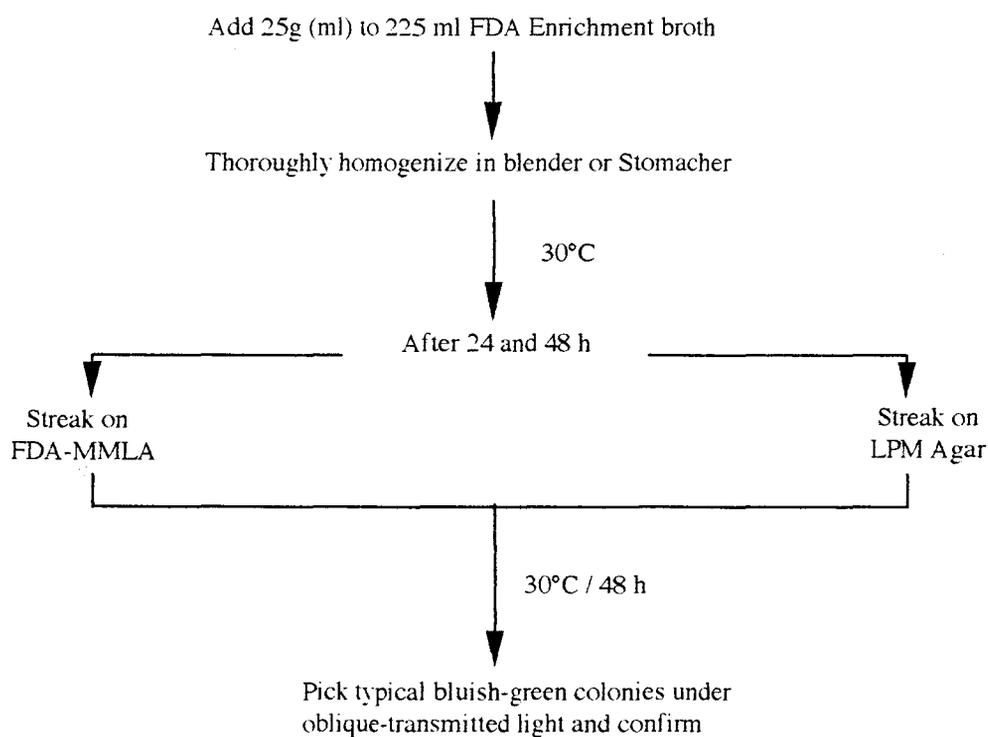
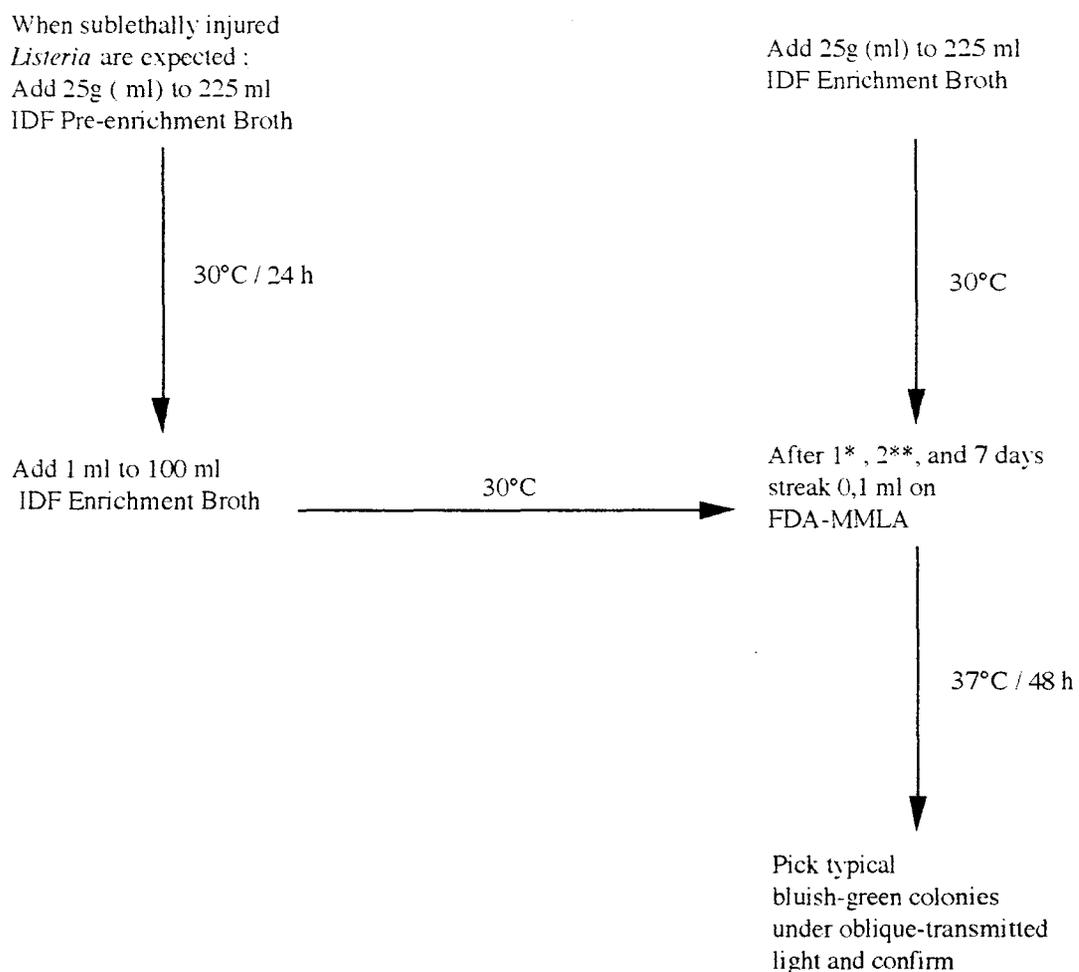


Fig 4 : Procédure de la Provisional dairy Federation (IDF) pour l'isolement de *L. monocytogenes* de lait et produits laitiers (RYSER et MARTH 1991a).



* raw milk

** except raw milk

Fig 5 : Procédure originale USDA pour l'isolement de *L. monocytogenes* de viandes et de volailles, 1986 à Avril 1989 (RYSER et MARTH 1991a).

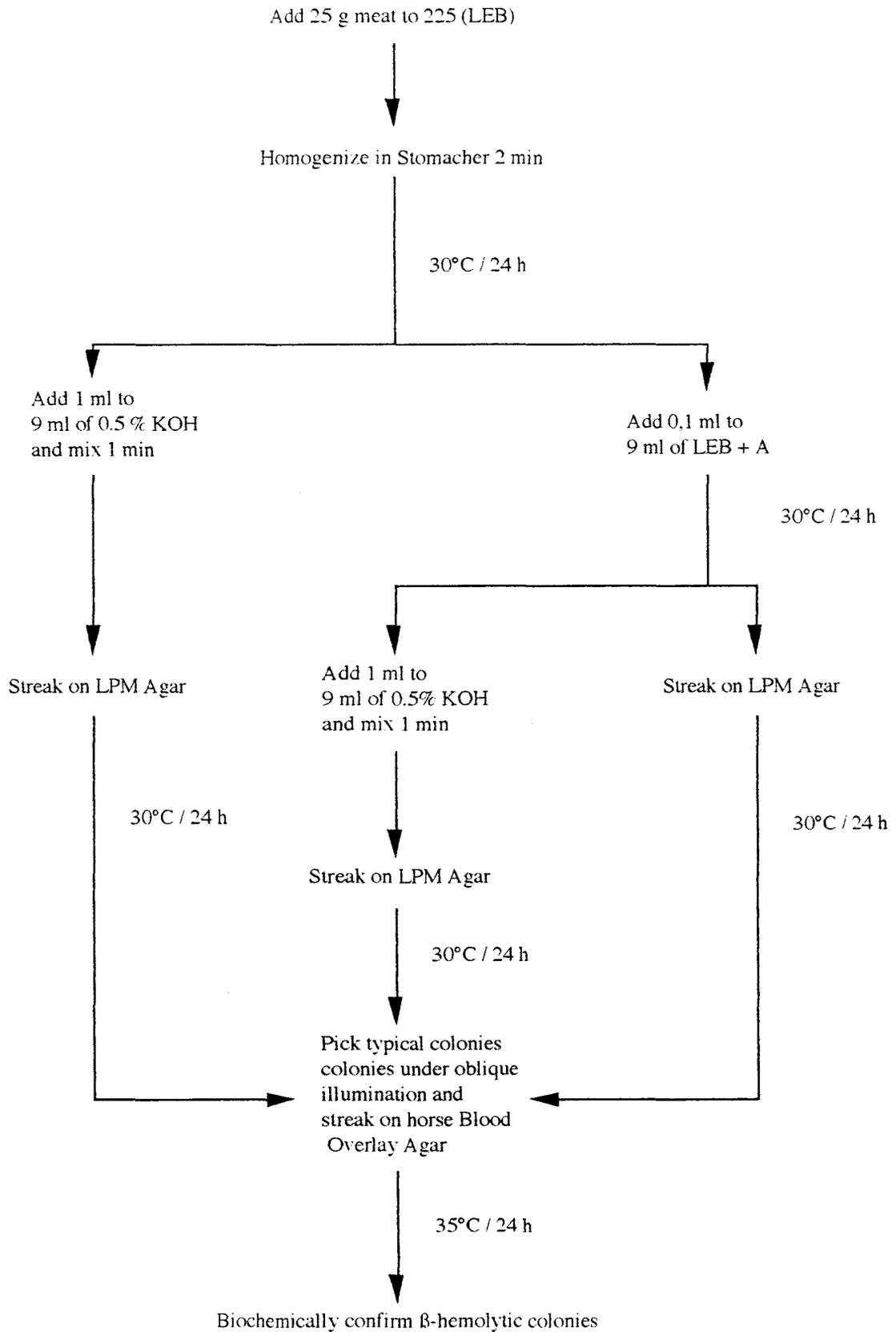
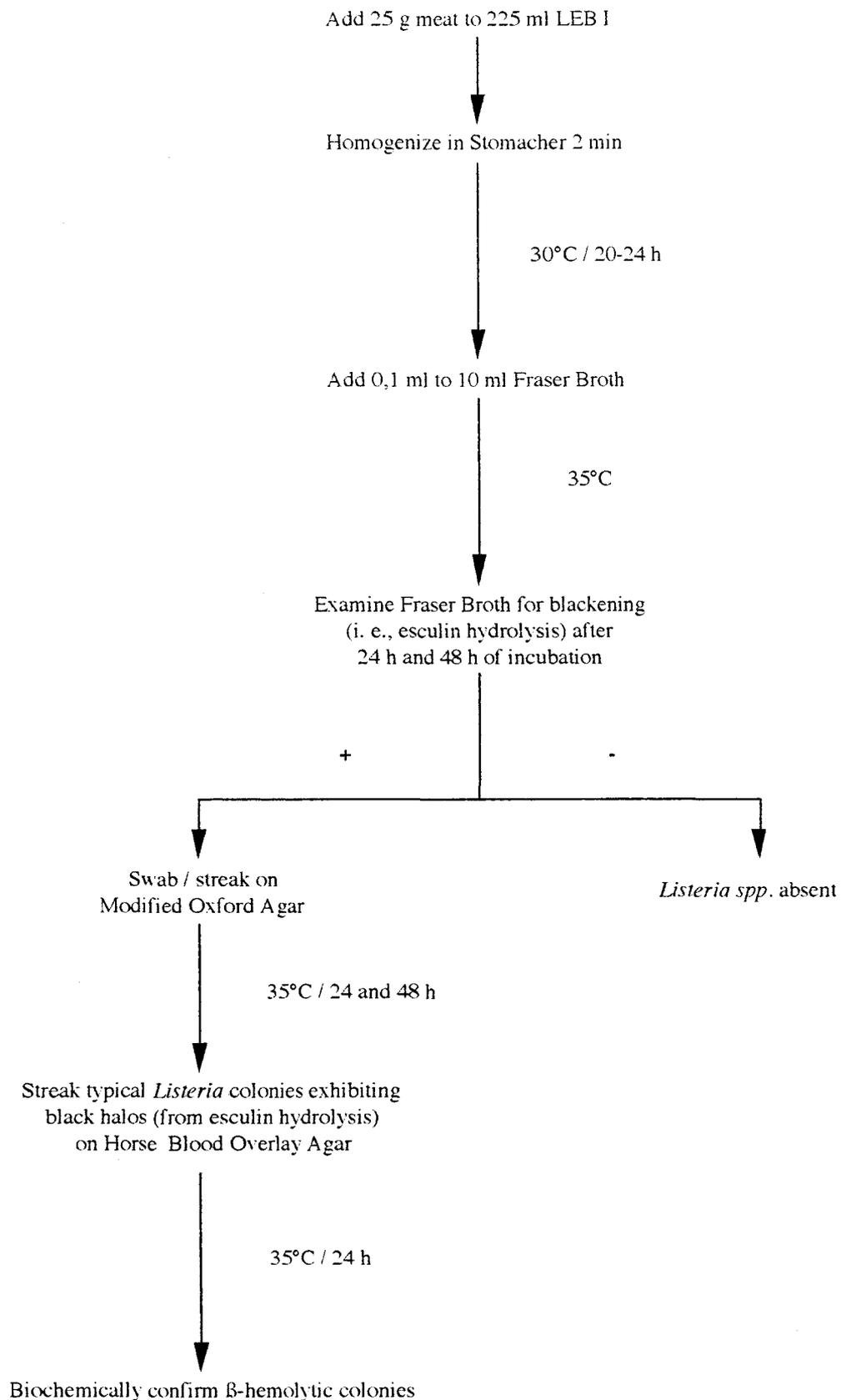


Fig 6 : Procédure révisée de l'USDA pour l'isolement de *L. monocytogenes* de viandes et de volailles, Mai 1989 à Décembre 1991 (RYSER et MARTH 1991a).



Ces deux milieux, contenant de l'esculine comme système indicateur, permettent une détection plus rapide de *Listeria spp* (FRASER et SPERBER 1988).

Les quelques méthodes présentées dans ce chapitre ne sont pas les seules existantes. Elles sont en fait le résultat de recherches menées dans différents pays. Les procédures USDA et FDA élevées au rang non officiel de "méthodes standards" servent plutôt de base de travail et font l'objet de modifications par les utilisateurs.

Récemment, dans le cadre de la réglementation internationale du contrôle microbiologique des produits alimentaires, un projet de norme ISO CD 11290 sur la procédure de recherche des *Listeria* a été établi. La Figure 7 présente les directives générales de cette méthode encore en cours de rédaction. Celle-ci s'applique à tous les produits alimentaires et ne dure que 72 heures.

En France, l'Association Française de Normalisation (AFNOR) a étudié les directives générales de la norme ISO pour mettre en place une méthode de routine concernant la recherche de *Listeria monocytogenes* dans les produits destinés à la consommation humaine et animale. Le protocole adopté en Décembre 1993 par l'AFNOR (V 08-055) diffère du projet de norme ISO CD 11290, par l'absence de l'isolement, à 48 heures d'incubation de l'enrichissement primaire. (Cf Matériel et méthodes).

Parmi les procédures de recherche de *Listeria*, aucune n'a été spécifiquement recommandée pour l'analyse des produits de la mer, la méthode FDA étant généralement la plus utilisée.

LOVETT *et al.* (1991) ont comparé les premiers protocoles développés par la FDA et l'USDA dans le cas des fruits de mer (crevettes, crabes). Pour réaliser cette étude, des fruits de mer ont été contaminés artificiellement avec des *L. monocytogenes* ScottA ou SE 68 en bon état ou préalablement stressées par un choc thermique de 5 minutes à 58°C. L'équivalence des deux procédures a été mise en évidence pour le recouvrement des cellules non stressées. Cependant la méthode USDA semble préférable si la charge en micro-organismes de l'aliment est de l'ordre de 10^4 à 10^5 bactéries /g.

Dans le cas des cellules stressées, la procédure FDA offre un taux de détection des *Listeria* plus faible que la méthode USDA. Cette observation peut s'expliquer par une plus grande sélectivité de la gélose LPM (USDA) par rapport à la gélose FDA-MMLA (FDA).

Cette sélectivité bien que limitante pour le recouvrement des cellules stressées, a l'avantage de supprimer les flores indigènes, d'où résulte un meilleur recouvrement des cellules stressées.

Dans le cas d'une faible flore de compétition, ($<10^2$ bactéries /g) la méthode FDA semblerait plus adaptée pour la mise en évidence des bactéries stressées.

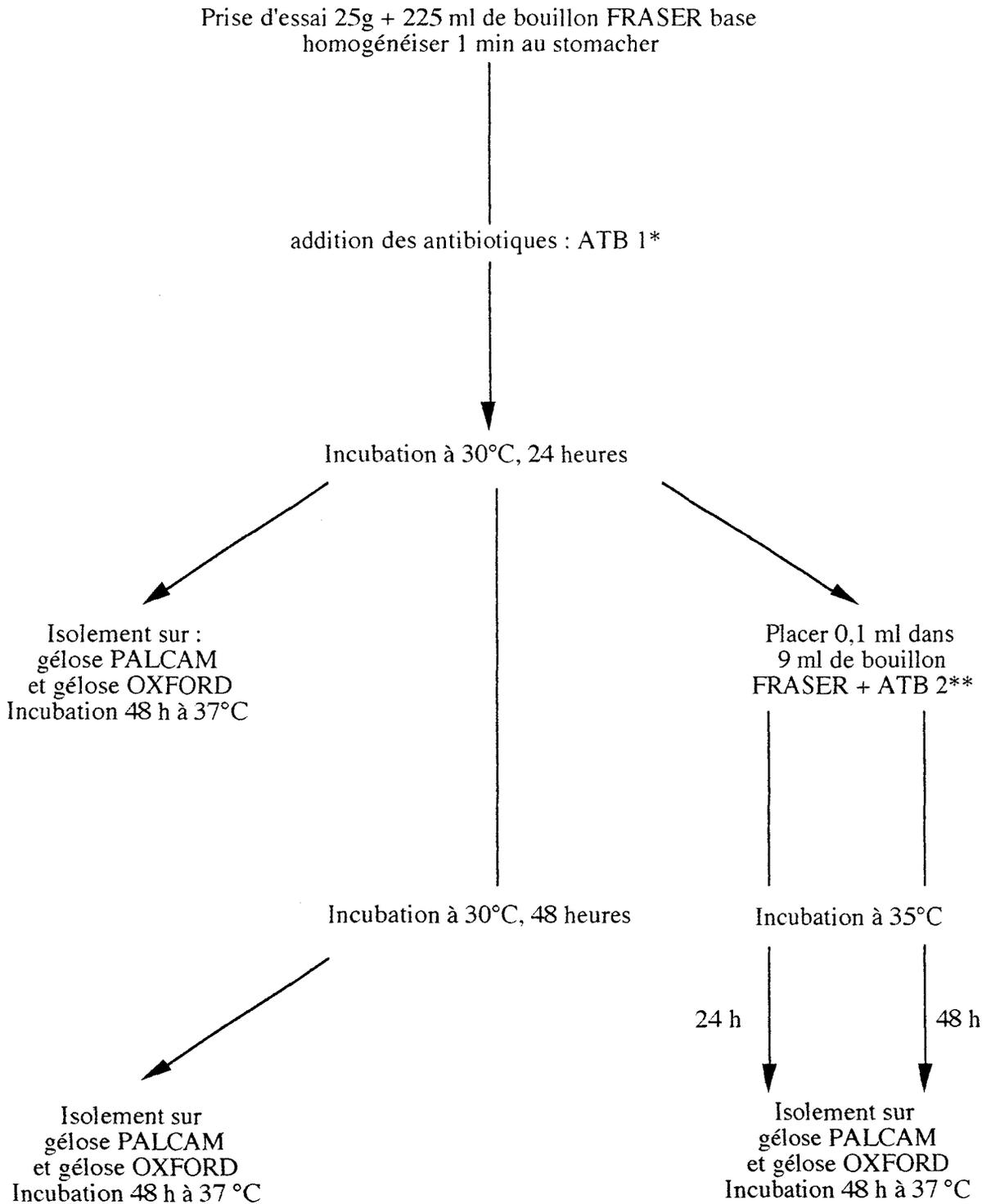


Fig 7: Directives générales préconisées par le projet de norme ISO CD 11290 en cours de rédaction.

*ATB 1 : 10 mg / l d'acide nalidixique
12.5 mg / l d'acriflavine
0.5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

**ATB 2 : 20 mg / l d'acide nalidixique
25 mg / l d'acriflavine
0.5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

Une étude comparative des méthodes originelles et modifiées réalisée par WARBURTON *et al.* (1992) a révélé que ces deux procédures appliquées aux fruits de mer sont relativement identiques. La comparaison des procédures modifiées USDA et FDA met en évidence un seul échantillon positif supplémentaire avec la méthode FDA.

Les géloses d'isolement ont fait l'objet d'études comparatives pour évaluer la possibilité de numération et de recouvrement de *L. monocytogenes*.

PARANJPYE *et al.* (1992) ont testé trois géloses : l'Oxford (OX), l'Oxford modifié (MOX) et le LPMFE (LPM contenant un indicateur fer / esculine) pour leur capacité à détecter *L. monocytogenes* (inoculée à 10^2 / ml) dans des saumons fumés contenant une flore de contamination (de 10^4 à 10^8 bactéries / ml). La visualisation et le recouvrement des colonies sont aisés sur l'Oxford où aucune flore de compétition n'apparaît à 24 heures d'incubation et reste très faible après 48 heures.

Les colonies de *Listeria* sont plus larges sur le MOX que sur l'OX rendant la lecture un peu plus difficile par l'existence de larges zones noires. Quelques contaminants peuvent apparaître sous forme de petites colonies blanches.

Le LPM modifié par l'addition de fer et d'esculine rend la différenciation totalement impossible entre les flores contaminantes et *Listeria*.

L'OX et le MOX permettent une numération et un recouvrement de *L. monocytogenes* à partir de saumons fumés contaminés artificiellement. Cependant, le MOX semble un peu moins sélectif que l'OX pour les échantillons de saumons fumés à froid.

GUNASINGHE *et al.* (1994) ont testé les géloses Oxford (OX) et PALCAM dans le cas de produits carnés. Sur PALCAM, les colonies sont bien isolées et facilement repérables, alors que sur l'OX des colonies esculine négative se développent rendant le comptage des colonies esculine positive plus difficile. De plus, le nombre de colonies détectées sur gélose PALCAM est plus important que sur la gélose OX.

A partir de produits carnés, la gélose PALCAM semble la plus appropriée pour la détection des *Listeria*, combinant forte sélectivité et haute sensibilité.

Aucune gélose d'isolement ne semble clairement supérieure à une autre. En Europe, la gélose PALCAM connaît un vif succès alors qu'en Amérique du Nord les géloses LPM et Oxford sont les plus utilisées (FARBER et PETERKIN 1991).

III. 2. METHODES ALTERNATIVES DE DETECTION DES *LISTERIA*.

Jusqu'en 1993, bien que les "méthodes standards" préconisées par l'USDA et FDA aient considérablement réduit le temps d'analyse par rapport aux méthodes traditionnelles

d'enrichissement à froid, ces délais sont restés pour un large secteur d'industries alimentaires inacceptables. La nécessité de disposer de méthodes rapides s'est imposée pour certains produits hautement périssables comme le lait, la viande crue, la volaille et les produits de la mer.

Les récents progrès réalisés en immunologie et en génétique bactérienne ont permis le développement des tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) et des tests d'hybridation de sondes nucléiques. Ces techniques capables de détecter *Listeria*, dans un échantillon alimentaire après plusieurs heures d'enrichissement primaire et secondaire, facilitent un screening en *Listeria spp* dans de nombreux produits.

III. 2. 1. Tests ELISA.

Les tests immunologiques sont basés sur l'interaction entre un anticorps et l'antigène correspondant, couplée à un système de détection faisant intervenir une réaction enzymatique (HEFLE 1995). Le test ELISA par sa simplicité et ses faibles exigences en matériel, constitue une méthode de choix pour les petits laboratoires.

Les techniques immuno-enzymatiques, orientées dans la détection des antigènes, ont été mises en oeuvre pour la détection des antigènes flagellaires de *Listeria*.

La méthode sandwich est la plus utilisée (Fig 8). Les anticorps anti-*Listeria* adsorbés sur un support (cône ou microplaque) reconnaissent les antigènes de *Listeria* libérés par chauffage. Les éléments restés libres sont éliminés par lavage. Des anticorps conjugués marqués par une enzyme sont ajoutés et vont se fixer sur les antigènes de *Listeria* déjà complexés aux anticorps du support. De nouvelles étapes de lavage éliminent les anticorps conjugués non fixés. Le substrat de l'enzyme transformé par celle-ci et l'addition d'un chromogène permettent le développement d'une coloration, dont l'intensité est évaluée par mesure de la densité optique, après arrêt de la réaction enzymatique. L'utilisation de témoins positifs (des antigènes de *Listeria* purifiés) et de témoins négatifs (antigènes d'un autre genre bactérien ou d'un tampon) permettent de s'assurer du bon déroulement de la réaction immuno-enzymatique et de calibrer l'appareil de lecture (RYSER et MARTH 1991 b).

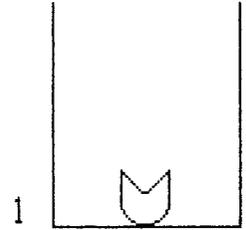
Le succès d'une réaction immunologique réside dans la spécificité de l'anticorps et le nombre de sites de fixation sur l'antigène où cet anticorps peut s'accrocher sélectivement.

Avant 1975, la technique de production des anticorps permettait d'obtenir des anticorps polyclonaux peu spécifiques. Des anticorps monoclonaux hautement spécifiques sont aujourd'hui produits.

En Novembre 1987, Organon Teknika Corporation a commercialisé un kit de détection de *Listeria spp* utilisant des anticorps monoclonaux, connu sous le nom de *Listeria Tek Assay*.

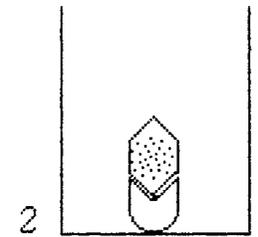
Fig 8 : Méthode sandwich utilisée dans les tests ELISA pour la recherche de Listeria.

1 Anticorps adsorbé sur le puits.



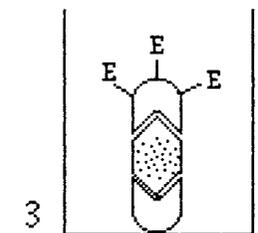
2 Ajout d'un échantillon pouvant contenir des antigènes de Listeria.

Lavage.



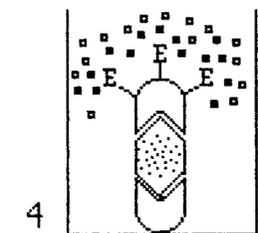
3 Ajout de l'anticorps spécifique marqué (conjugué).

Lavage.



4 Ajout du substrat.

Le développement d'une coloration signale la présence d'antigène de Listeria.



D'autres kits immunoenzymatiques détectant *Listeria spp* sont aujourd'hui disponibles sur le marché, comme le Kit TRANSIA, le kit TECRA, le kit VIDAS. Mais l'existence de nombreux cas de listériose a incité les constructeurs à la création d'un kit pouvant détecter spécifiquement *L. monocytogenes* à l'aide de sondes nucléiques.

III. 2. 2. Hybridation de sondes nucléiques.

La technique d'hybridation d'acides nucléiques constitue une approche intéressante dans la détection des *Listeria*. L'optimisation des conditions d'hybridation mais aussi le développement de la technique de séquençage de l'ADN, ont permis l'introduction des réactions d'hybridation de sondes nucléiques pour la détection d'agents pathogènes : *Escherichia coli*, *Yersinia*, *Salmonella* et *Listeria* en particulier.

Le principe de l'hybridation nucléique est simple. Chaque micro-organisme détient une information génétique qui lui est spécifique. Cette information stockée au niveau des gènes est codée sous forme de ADN ou ARN. La détermination d'un fragment d'acide nucléique codant pour une molécule particulière, comme un facteur de virulence, peut être utilisée pour identifier un genre bactérien, voire une espèce bactérienne. Une fois le fragment d'acide nucléique identifié et séquencé, il est possible de néosynthétiser une sonde complémentaire de ce fragment alors appelé matrice cible. Cette sonde, marquée par radioactivité ou par un résidu de fluoresceïne, en présence d'acide nucléique monocaténaire se fixe sur la partie complémentaire de la matrice cible révélant l'existence du micro-organisme recherché.

Les méthodes d'hybridation peuvent se faire selon deux approches en fonction de la nature de l'acide nucléique : bicaténaire (ADN) ou monocaténaire (ARN). Le ADN doit être dénaturé pour donner naissance à des brins simple chaîne alors que le ARN peut être utilisé directement.

Dans les deux cas, la réussite de l'hybridation est étroitement liée au nombre de copies de la matrice cible. En général un enrichissement est réalisé pour atteindre un minimum de 10^4 cellules / ml.

Pour augmenter la sensibilité de la détection, des réactions d'amplification du ADN sont utilisées. La "Polymerase Chain Reaction" (PCR) permettant d'obtenir un nombre important de copies du ADN est basée sur la répétition de trois étapes :

- . dénaturation du ADN en simple brin fournissant la matrice cible,
- . fixation de l'amorce,
- . extension du primer reconstituant le brin complémentaire

(WOLCOTT 1991).

L'utilisation du r ARN comme cible ne nécessite pas cette étape d'amplification. En effet, l'existence de multiples copies du r ARN dans la cellule (1000 à 10000 exemplaires par cellule) constitue une amplification naturelle .

En 1985, Gene Trak Systems est la première firme à commercialiser un kit de détection des *Salmonella* dans les produits alimentaires employant une sonde nucléique.

En 1988 cette même société a commercialisé un kit pour la détection des *Listeria spp* connu sous le nom de Gene Trak Isotopic Listeria Assay. Ce kit fait intervenir une sonde spécifique du genre *Listeria* marquée au Phosphore³², dont la cible est une région déterminée du r ARN 16 S. Les obstacles majeurs pour une utilisation répandue de ce kit sont la durée de demi vie du P³² limitée à 10 jours, la nécessité de détenir une licence d'accreditation pour la manipulation des réactifs radioactifs et l'importance du matériel requis.

En 1989, ce kit a été remplacé par le Gene Trak Colorimetric Listeria Assay où le marquage au P³² est substitué par un marquage à la fluoresceïne (RYSER et MARTH 1991 b).

Cette technique comporte 4 étapes : lyse des cellules, hybridation avec la sonde, capture, détection (cf Matériel et méthodes).

Les arguments comme :

- . le haut degré de spécificité vis à vis de *Listeria spp* ,
- . la comparaison favorable par rapport aux procédures conventionnelles,
- . la simplicité d'utilisation ,
- . la rapidité,

sont des éléments importants dans la recherche de *Listeria* de produits alimentaires.

Cette technique d'hybridation d'acides nucléiques a été récemment appliquée pour la détection de *L. monocytogenes* .

Deux kits spécifiques *L. monocytogenes* utilisant l'hybridation nucléique sont actuellement disponibles sur le marché français : le GENE TRAK et le GEN PROBE (cf Matériel et Méthodes).

IV. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE.

IV. 1. GENERALITES.

Jusqu'à présent, la sécurité et la définition de la durée de vie commerciale des aliments sont garanties de façon traditionnelle par le contrôle des matières premières et du produit fini, couplées aux critères d'hygiène et des paramètres technologiques à respecter au cours du procédé de transformation.

Le manque d'efficacité de cette démarche, reposant sur l'expérience, le soin et la vigilance du personnel de fabrication, est à l'origine du développement du concept de l'HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) et de la microbiologie prévisionnelle. L'HACCP est une approche structurée et systématique de recherche des points critiques et des options de maîtrise tant au niveau production que distribution (JOUVE 1993 a). Cette application est d'autant plus efficace qu'elle dispose de bases de données renseignant sur l'évolution des micro-organismes vis à vis de la croissance, de la survie ou de l'inactivation.

Depuis une dizaine d'années, la microbiologie prédictive s'est développée pour répondre au besoin de l'HACCP. Ainsi, de l'étude de niveau seuil de réponse des micro-organismes à des facteurs pris isolément, nous sommes passés à l'étude de niveau seuil de croissance en présence de combinaisons de facteurs inhibiteurs.

De plus, l'utilisation de l'outil informatique a permis une forme de modélisation, en vue de prédire le comportement des micro-organismes pathogènes et / ou d'altération. Le comportement des micro-organismes et leur croissance, mettant en oeuvre un nombre considérable de mécanismes et de propriétés, ne permettent pas d'établir un modèle général mais plutôt une représentation partielle dont le mérite est de créer des outils aidant la conduite des procédés.

Deux types de modèles peuvent être envisagés (BOURGEOIS 1991) :

- * les modèles probabilistiques permettant de prévoir la probabilité d'une réponse microbienne dans des conditions données ex : production de toxine, présence de micro-organismes. Les informations obtenues sont d'ordre qualitatif

- * les modèles cinétiques permettant de prévoir la concentration atteinte par une souche bactérienne. Ces modèles s'appliquent à la prévision du délai d'apparition du seuil limite du nombre de bactéries mais aussi à la prévision de la durée de conservation en cas d'altération d'origine microbiologique. Les informations obtenues sont qualitatives pour une souche déterminée, à savoir : temps de latence, taux de croissance, maximum de croissance.

Ces modèles cinétiques sont nombreux et se différencient par le nombre de facteurs pris en compte pour la modélisation.

IV. 2. MODELISATION

IV. 2. 1. Modélisation d'un seul facteur : l'effet de la température

La connaissance du comportement du micro-organisme à une température donnée et de la relation entre croissance et température permet, connaissant de nombre initial de micro-organismes et le seuil d'effet, de prévoir approximativement la durée de conservation à une température donnée.

L'importance de ce facteur a fait l'objet de nombreux travaux et plusieurs modèles ont été proposés (Mc MEEKIN *et al.* 1993), reliant le taux de croissance et la T°:

* les modèles basés sur une relation de type ARRHENIUS où le taux de croissance est exprimé en fonction de l'inverse de la température selon l'équation du type $k = A e^{-E_a/RT}$ qui peut se mettre sous la forme $\text{Log } k = \text{Log } A - E_a / RT$.

K : taux de croissance

A : constante

T : température absolue

R : constante des gaz parfaits

E_a : quantité thermodynamiquement déterminée appelée énergie d'activation

Modèles : SCHOOLFIELD ou ADAIR (ADAIR *et al.* 1989)

* les modèles dits "racine carrée", basés sur une relation de type BELEHRADEK où la racine carré du taux de croissance est exprimée en fonction de la température selon l'équation du type $\sqrt{k} = b (T - T_{\min})$.

K : taux de croissance

b : coefficient de régression

T : température de conservation

T_{min} : température minimale de croissance

Modèle : RATKOWSKY (RATKOWSKY *et al.* 1982)

IV. 2. 2. Modélisation multifactorielle.

Pour pouvoir prédire l'évolution d'une population microbienne, il est nécessaire d'analyser la contribution des facteurs essentiels, afin de maîtriser la qualité microbiologique des produits.

Le paramètre significatif sur le plan de la durée de vie du produit est le plus souvent la concentration de micro-organismes d'une espèce déterminée. Il paraît donc intéressant de modéliser directement l'évolution de la population microbienne en fonction de facteurs significatifs comme la température, le taux de sel, l'*a_w*, le pH...(BOURGEOIS 1991).

La nature complexe du phénomène de croissance a montré qu'il était préférable de modéliser séparément le taux de croissance dépendant des caractéristiques de l'environnement du micro-organisme et la phase de latence directement liée à l'état physiologique du micro-organisme. La détermination de ces deux paramètres est malaisée. Les fonctions sigmoïdes peuvent être utilisées pour ajuster les courbes expérimentales obtenues avec diverses combinaisons des facteurs étudiés. Elles sont souvent choisies car elles présentent comme la courbe de croissance bactérienne une phase initiale sans beaucoup de changement, une phase d'accélération et une phase stationnaire. Les deux fonctions les plus utilisées sont la fonction logistique et l'équation de Gompertz. La différence entre ces deux fonctions est la symétrie, autour du point représentant le maximum du taux de croissance, rencontrée dans la fonction logistique et qui n'existe pas dans la fonction de Gompertz.

Equation logistique :

$$L(t) = A + C / (1 + e^{-B(t-M)})$$

Equation modifiée de Gompertz :

$$L(t) = A + C (e^{-e^{-B(t-M)}})$$

La concentration microbienne au temps t est exprimée : $L(t)$ (nombre en log 10 de bactéries au temps t), en fonction de quatre paramètres (SKINNER *et al.* 1994).

A : Asymptote de log 10 de bactéries quand $t \rightarrow \infty$

C : concentration maximale atteinte quand t croît à l'infini

B : taux de croissance relatif au temps $t = M$

M : temps où le taux de croissance est maximal.

La détermination de ces quatre paramètres constitue le modèle primaire qui décrit indirectement les paramètres cinétiques du comportement microbien (Mc MEEKIN *et al.* 1993)

Le taux de croissance (en log 10 bactéries / heure) : $\mu = BC / e$

Le temps de génération : $GT = \log_{10}(2) e / BC$

Le temps de latence : $\lambda = M - 1/B$

Densité de population maximale (en log 10 cfu / ml) : $DPM = A + C$

L'utilisation des fonctions sigmoïdales a été couplée à la mise en place d'un modèle secondaire décrivant les variations des paramètres du modèle primaire (soit A, C, B, M) en fonction des différents facteurs étudiés (WHITING et BUCHANAN 1994). Ces modèles sont généralement des surfaces de réponse faisant appel à une équation de type polynomial :

$$y = a + b_1s + b_2t + b_3p + b_4s^2 + b_5t^2 + b_6p^2 + b_7st + b_8sp + b_9tp + e$$

y = paramètre modélisé, exemple : B

s : concentration en NaCl (% p/v)

t : température(°C)

p : pH

e : erreur aléatoire.

Ce type de fonction fait intervenir les effets des facteurs, les interactions entre facteurs, et les interactions quadratiques.

Lors de la modélisation, le log du paramètre est fréquemment utilisé pour stabiliser la variance (WHITING et BUCHANAN 1994).

Le calcul des coefficients se fait mathématiquement selon le critère des moindres carrés (modèle linéaire) ou le critère du maximum de vraisemblance (modèle non linéaire) qui permettent de minimiser la somme des écarts obtenus pour la différence entre les valeurs observées et prédites (HUET *et al.* 1992).

Il existe d'autres fonctions de lissage, notamment le modèle de SCHNUTE, STANNARD, mais d'un point de vue pratique, l'équation de GOMPertz est la plus utilisée (ZWIETERING *et al.* 1990). Celle-ci a été utilisée notamment dans le cas de *Listeria* par BUCHANAN *et al.* 1989 et BUCHANAN et PHILLIPS (1990).

D'autres modèles multifactoriels ont été développés. En 1989, DAVEY a modifié la relation d'ARRHENIUS par introduction du facteur a_w . GRAU ET VANDERLINDE (1993) ont appliqué cette nouvelle équation en faisant intervenir le facteur pH, pour la modélisation de la croissance de *Listeria monocytogenes*.

La relation de type BELEHRADEK a également été modifiée par introduction du facteur a_w (Mc MEEKIN *et al.* 1987) ou du facteur pH (ADAMS *et al.* 1991). Récemment WIJZES *et al.* (1993) ont utilisé la combinaison des facteurs a_w et pH dans une relation de type BELEHRADEK pour la modélisation de la croissance de *Listeria monocytogenes*.

IV. 3. ACQUISITION DES DONNEES.

La détermination de la loi d'évolution d'un micro-organisme en fonction des paramètres physico-chimiques d'un aliment passe par l'acquisition d'une base de données, à l'aide de plans d'expériences (CLIQUET *et al.* 1993).

Une méthode classique consiste à faire varier chaque facteur séparément en maintenant les autres constants. Cette méthode coûteuse en temps et en matériel, ne permet pas d'estimer les interactions pouvant exister entre les facteurs, puisque ces interactions ne sont décelables que par l'étude simultanée des facteurs.

L'approche globale de l'influence de chacun des facteurs et de leurs interactions est possible par l'utilisation d'un plan d'expériences faisant varier ces facteurs en même temps.

Trois étapes sont nécessaires pour sélectionner le plan d'expériences : le choix d'un modèle, le choix des facteurs, le choix de la matrice expérimentale.

IV. 3. 1. Terminologie.

Par **facteurs**, sont désignées les variables contrôlées dont on étudie l'influence sur la réponse considérée.

Deux types de facteurs peuvent être rencontrés :

les facteurs qualitatifs (nature d'un substrat)

les facteurs quantitatifs (pH, température...)

Chaque facteur est étudié à différents **niveaux**. Les niveaux sont représentatifs des valeurs données aux facteurs pour évaluer leur variation (ex : pour le facteur température, 4° et 20 °C).

Le plan d'expériences est déterminé par un nombre précis de **traitements**. Un traitement représentant une combinaison de niveaux des facteurs étudiés.

Dans le contexte des plans d'expériences, les niveaux des facteurs sont recodés de sorte que 0 corresponde à la valeur centrale. Cela revient à un changement d'unité de mesure et un changement d'origine qui permettent de traiter tous les facteurs de la même manière. Les variables sont alors dites centrées réduites ou codées. Ce **codage** présente le double avantage de simplifier la construction du plan d'expériences et les calculs et de rendre interprétables les paramètres du modèle.

Un traitement ne comportant que des combinaisons de niveaux centraux est appelé point central.

IV. 3. 2. Choix d'un modèle.

Le phénomène observé doit être décrit et expliqué en fonction des facteurs étudiés.

Le modèle choisi doit décrire les résultats expérimentaux et permettre de prévoir la réponse même dans les conditions non expérimentées.

IV. 3. 3. Choix du domaine expérimental : choix des facteurs et de leurs niveaux.

Pour établir un plan d'expériences, il faut sélectionner les facteurs qui risquent d'intervenir le plus sur la réponse du système et délimiter leur domaine de variation et les niveaux qu'ils vont prendre.

Le nombre de niveaux dépend de la relation liant la réponse (Y) au facteur considéré. Dans le cas d'une relation linéaire deux niveaux sont suffisants pour la construction du plan. Si une courbure prononcée est suspectée trois niveaux ou plus sont alors utilisés.

IV. 3. 4. Les plans d'expériences.

Définir le plan expérimental consiste à préciser pour chaque expérience le traitement qui lui correspond. La liste de ces traitements forme la matrice d'expériences.

Cette matrice d'expériences doit répondre à certaines propriétés :

- l'orthogonalité permettant de déterminer indépendamment les différents effets.
- la séquentialité autorise la réutilisation de tout ou une partie des expériences déjà effectuées pour l'étude d'un nouveau problème posé.
- la répétabilité des résultats, celle-ci augmentant la puissance des estimations.
- l'isovariance par rotation traduit la qualité des prédictions des réponses expérimentales.

Un plan est isovariant par rotation lorsque la qualité de la prédiction, mesurée par la variance, est identique en tous points équidistants du point central. Les points situés à une même distance du centre sont considérés comme d'égale importance, aucune direction n'est privilégiée.

Il existe de nombreux plans d'expériences qui permettent de décrire plus ou moins bien le phénomène observé, on peut citer les plans factoriels complets, les plans factoriels fractionnaires et les plans composites centrés

Le plan factoriel complet :

Dans ce plan toutes les combinaisons de n niveaux des k facteurs sont étudiées.

L'ensemble des combinaisons est égale à n^k . La réponse est décrite en fonction de tous les effets possibles des facteurs et de leurs interactions.

Exemple : un plan 2^3 à trois facteurs ($k = 3$) et deux niveaux ($n = 2$, avec un codage $-1, 1$) permet de connaître de façon générale les grandes tendances d'un phénomène et de s'orienter rapidement vers une zone de plus grand intérêt dans l'optique d'une optimisation, sans permettre d'étudier une quelconque courbure (effet quadratique).

Exemple : Un plan factoriel 3^3 , (trois facteurs $k = 3$) à trois niveaux ($n = 3$, avec un codage : $-1, 0, 1$) nécessite au minimum 27 traitements expérimentaux, et permet d'étudier les effets quadratiques qui existent dès l'approche d'un optimum.

La réponse peut être modélisée par un modèle polynômiale dont les paramètres sont estimés par ce plan factoriel à 3 facteurs.

Les plans factoriels fractionnaires :

Ce plan ne permet pas d'estimer tous les effets, car certains effets sont regroupés. Les effets sont dits confondus par le plan et seule une certaine combinaison linéaire de ces effets peut être estimée. Ces plans sont très utiles pour réduire le nombre d'expériences à condition d'accepter un certain risque.

Les plans composites centrés :

Ils offrent une alternative économique aux plans factoriels. Avec un nombre d'expériences plus réduit, ils permettent d'estimer tous les effets : linéaires, quadratiques et les interactions de deux facteurs.

Le plan composite centré se décompose en :

- * un plan factoriel 2^k permettant d'estimer les effets principaux et les interactions entre facteurs ($2 =$ nombre de niveaux du facteur étudié avec un codage -1 et 1 , k nombre de facteurs étudiés.)
- * des points axiaux permettant d'évaluer les effets quadratiques
- * une répétition du point central vérifiant la répétabilité de la réponse.

Exemple : un plan composite centré à trois facteurs comprend :

- 8 points expérimentaux situés aux sommets d'un cube (de coordonnées $\pm 1, \pm 1, \pm 1$) et correspondent aux points expérimentaux du plan factoriel 2^3 (3 facteurs : X_1, X_2, X_3 , deux niveaux codés : $-1, +1$).
- 6 points expérimentaux sur les axes X_1, X_2, X_3 situés sur une sphère (de coordonnées $(\pm \alpha, 0, 0); (0, \pm \alpha, 0); (0, 0, \pm \alpha)$).
- N_0 : répétitions du point central de coordonnées $(0, 0, 0)$.

A chaque plan d'expériences, correspond une matrice d'expériences. La matrice d'expériences d'un plan factoriel complet 3^3 est définie de la façon suivante.

Facteur1	Facteur 2	Facteur 3
-1	-1	-1
0	-1	-1
+1	-1	-1
-1	0	-1
0	0	-1
+1	0	-1
-1	+1	-1
0	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	0
0	-1	0
+1	-1	0
-1	0	0
0	0	0
+1	0	0
-1	+1	0
0	+1	0
+1	+1	0
-1	-1	+1
0	-1	+1
+1	-1	+1
-1	0	+1
0	0	+1
+1	0	+1
-1	+1	+1
0	+1	+1
+1	+1	+1

Un certain nombre de conditions sont nécessaires pour obtenir, à partir de l'expérience, des résultats fiables.

Ces conditions concernent :

- * la standardisation de l'expérience : toutes les conditions expérimentales doivent être maintenues constantes tout au long d'une série d'essais afin que la variance résiduelle soit la plus faible possible.

- * la randomisation ou la répartition au hasard est nécessaire pour permettre la comparaison des résultats entre essais. Elle permet d'éliminer les variations dues à des variables non contrôlées éventuelles et de compenser les corrélations éventuelles.

- * le choix des réponses mesurées : elles doivent représenter avec le plus de précision possible le phénomène étudié et posséder des propriétés de répétabilité et de reproductibilité.

- * la formation de blocs : le problème du maintien de l'homogénéité des conditions expérimentales se pose si l'expérience doit s'effectuer en plusieurs parties ou "blocs". L'effet "bloc" décrit la variabilité entre 2 séries d'expériences. Il peut être calculé en intégrant dans la deuxième série d'expériences des traitements de la première série.

BUTS DU TRAVAIL

Listeria monocytogenes, bactérie pathogène opportuniste pour l'homme est largement répandue dans l'environnement et les produits alimentaires. L'amélioration des méthodes de détection et la multiplication des analyses des aliments confirment le risque potentiel pour la santé publique de la présence de *Listeria*, notamment dans les produits de la mer.

En collaboration avec l'IFREMER (Nantes) et la Confédération des Industries de Traitement des Produits des Pêches Maritimes (CITPPM), un projet d'étude de la qualité microbiologique des Saumons fumés vis à vis de *Listeria* a été mis en place en 1992.

Les axes de recherches mis en oeuvre pour répondre au problème de *Listeria* dans le saumon fumé sont les suivants :

- évaluation de la contamination en *L. monocytogenes* du saumon fumé, au cours de la fabrication et de la conservation ,

- adaptation des méthodes de détection et de dénombrement des *Listeria* spécifiquement au saumon fumé, afin d'apprécier la qualité microbiologique du produit et de mieux respecter la recommandation du Conseil Supérieur d'Hygiène de France vis à vis de *L. monocytogenes*,

- maîtrise du risque *L. monocytogenes* dans le saumon fumé par l'acquisition d'une meilleure connaissance du comportement de cette bactérie dans l'aliment, à l'aide de données analytiques et d'une approche plus fondamentale faisant appel à la microbiologie prévisionnelle.

MATERIEL ET METHODES

I. MATERIELS : SOUCHES BACTERIENNES ET PRODUITS ALIMENTAIRES.

I. 1. SOUCHES DE *LISTERIA* .

Les souches référencées de *Listeria*, utilisées dans notre étude, proviennent de la collection de l'Institut Pasteur de Paris :

- L. monocytogenes* 4b ATCC 19115,
- L. monocytogenes* 1/2b CLIP 12499,
- L. innocua* 6b ATCC 33091.

Une souche non référencée isolée au cours de nos analyses de saumon fumé et identifiée comme une *L. monocytogenes* par galerie API *Listeria* (Biomérieux Réf : 10 300) a également été employée.

Les souches de *Listeria*, conservées sur tube de conservation (Diagnostics Pasteur : DP, Réf : 63 683) à 4°C, sont remises en suspension avec 0,5 ml de bouillon nutritif (DP : Réf : 53 445), puis incubées 24 heures à 37°C.

A partir de ce tube, un isolement sur gélose TSA (DP Réf : 55 942) est effectué et incubé 24 heures à 37°C.

Une culture pure est réalisée en introduisant une colonie isolée, prélevée sur la gélose TSA, dans 10 ml de bouillon LEB (Merk Réf : 11951).

Après 24 heures d'incubation, la suspension obtenue est de l'ordre de 5.10^8 *Listeria* / ml.

I. 2. LES ECHANTILLONS ALIMENTAIRES.

Les échantillons de produits carnés, laitiers, végétaux et produits de la mer, utilisés pour l'étude des méthodes de détection de *Listeria*, ont été prélevés dans le circuit de distribution alimentaire français.

Les échantillons de saumons fumés proviennent soit du circuit de distribution soit directement d'ateliers de production de saumons.

Pour des raisons de confidentialité, nous avons gardé l'anonymat de ces producteurs, qui sont désignés par la suite sous le terme d'Entreprise 1 ou 2.

II. TECHNIQUES DE DETECTION DES *LISTERIA*.

II. 1. TECHNIQUES DE RECHERCHE DES *LISTERIA* .

II. 1. 1. Méthode "IPL".

Cette technique de détection des *Listeria* inspirée de l'annexe II de la Note de la DGAL 8041 du 16 Mars 1987, est schématisée dans la Fig 9.

Elle représente une compilation des "méthodes standards" FDA et USDA et de recherches menées à l'IPL. Les phases d'enrichissement primaire et secondaire inspirées de la procédure USDA sont réalisées dans un "Listeria Enrichment Broth" commercialisé par Merck (LEB, à ne pas confondre avec LEB I et LEB II USDA) (Annexe). Ce milieu voisin du FDA enrichment broth contient un système tampon maintenant le pH proche de la neutralité au cours de l'incubation.

L'incubation de 7 jours calquée sur la méthode originelle FDA rend cette technique particulièrement longue, mais elle a l'avantage de détecter les *Listeria* même dans un produit faiblement contaminé.

Une étude comparative effectuée à l'IPL sur des géloses sélectives (PALCAM, ALPAMY, LPM) pour la mise en évidence de *Listeria* dans les produits laitiers indique la supériorité de la gélose PALCAM (Annexe) pour les dénombrements "directs" (CATTEAU 1992).

Le dénombrement direct inclus dans la technique "IPL" n'existe pas dans les "méthodes standards" FDA, USDA.

II. 1. 2. Nouvelle technique de recherche des *Listeria* : norme AFNOR V 08-055.

La norme AFNOR V 08-055 utilise un enrichissement primaire, dans un bouillon Fraser dont les antibiotiques sont dilués au demi (Annexe), suivi d'un enrichissement secondaire dans le bouillon Fraser (Annexe) selon les directives générales du projet de norme ISO CD 11290 actuellement en cours de rédaction (cf Généralités). Mais l'isolement après 48 heures d'incubation de l'enrichissement primaire préconisé par le projet ISO a été supprimé (Fig 10).

Dans le cadre de notre étude, l'étape à Jo permettant un dénombrement direct a été ajoutée par rapport au protocole AFNOR.

La subculture est incubée à 30°C au lieu de 35°C pour conserver des conditions proches de celles déterminées dans l'application des kits immuno-enzymatiques (Fig 11).

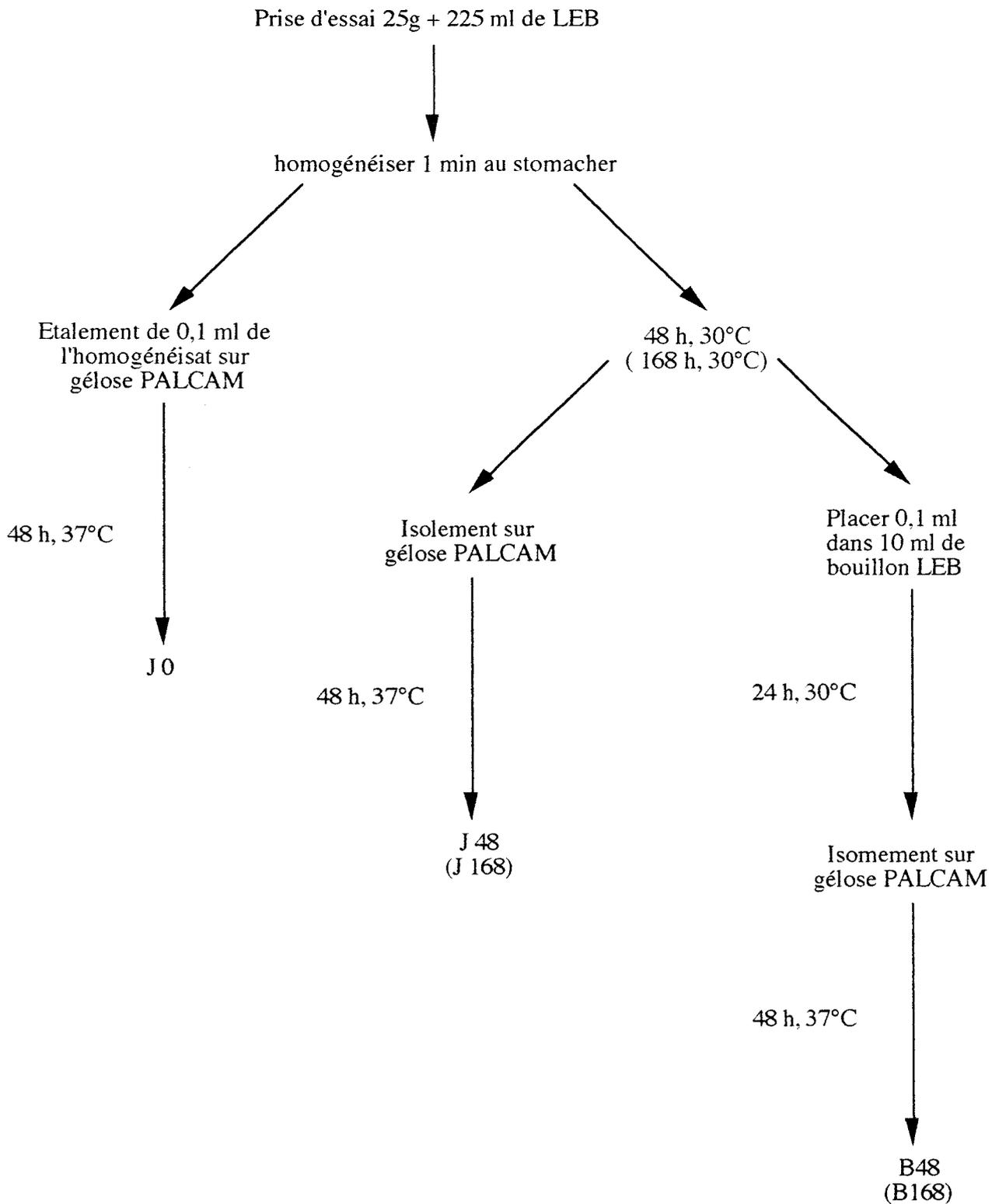


Fig 9 : Schéma de la technique de recherche de *Listeria* utilisée à l'IPL (1992).

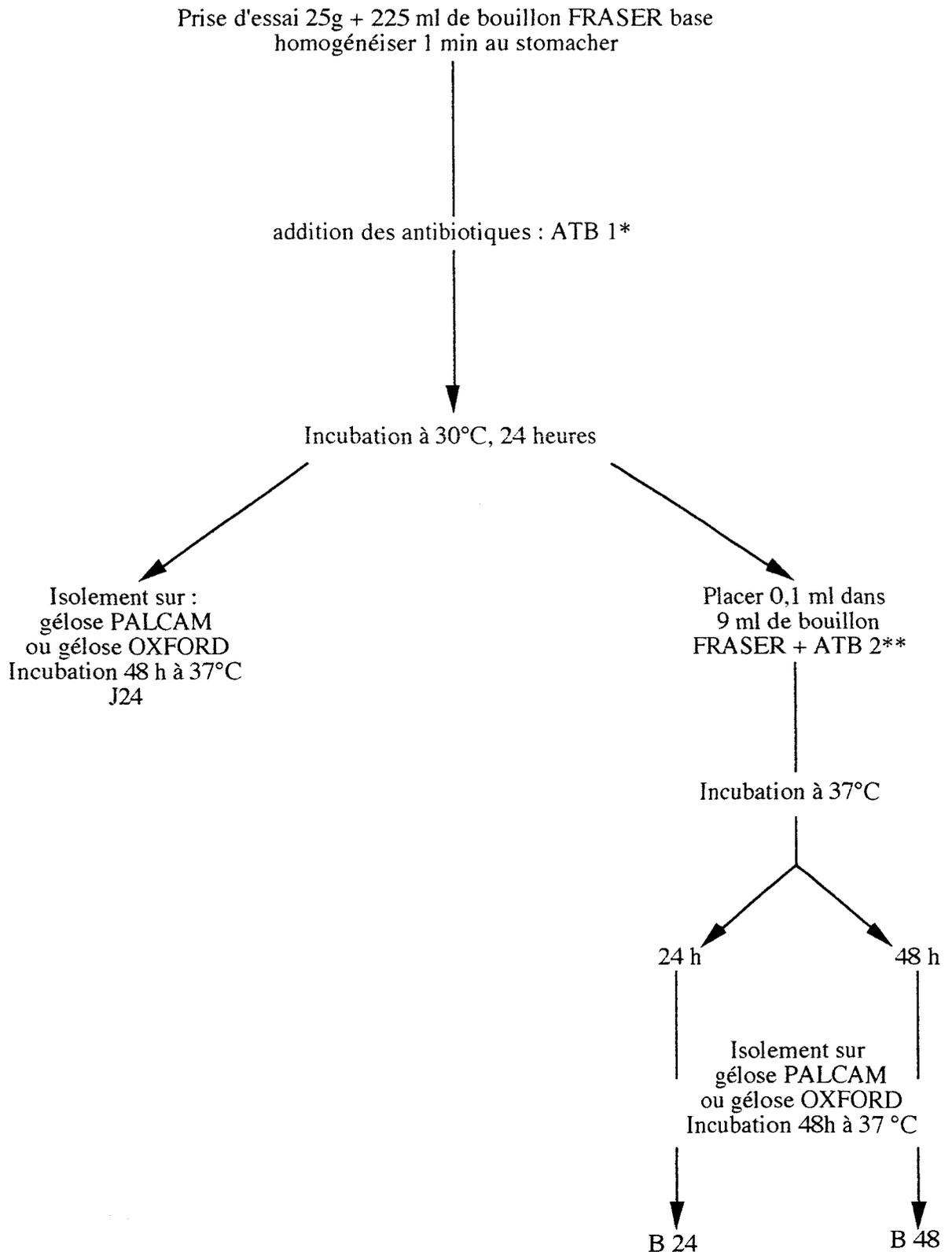


Fig 10 : Protocole adopté par l'AFNOR pour la recherche de *Listeria* (V 08-055).

J : enrichissement primaire B : enrichissement secondaire chiffre : temps d'incubation en heures

*ATB 1 : 10 mg / l d'acide nalidixique
12,5 mg / l d'acriflavine
0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

**ATB 2 : 20 mg / l d'acide nalidixique
25 mg / l d'acriflavine
0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

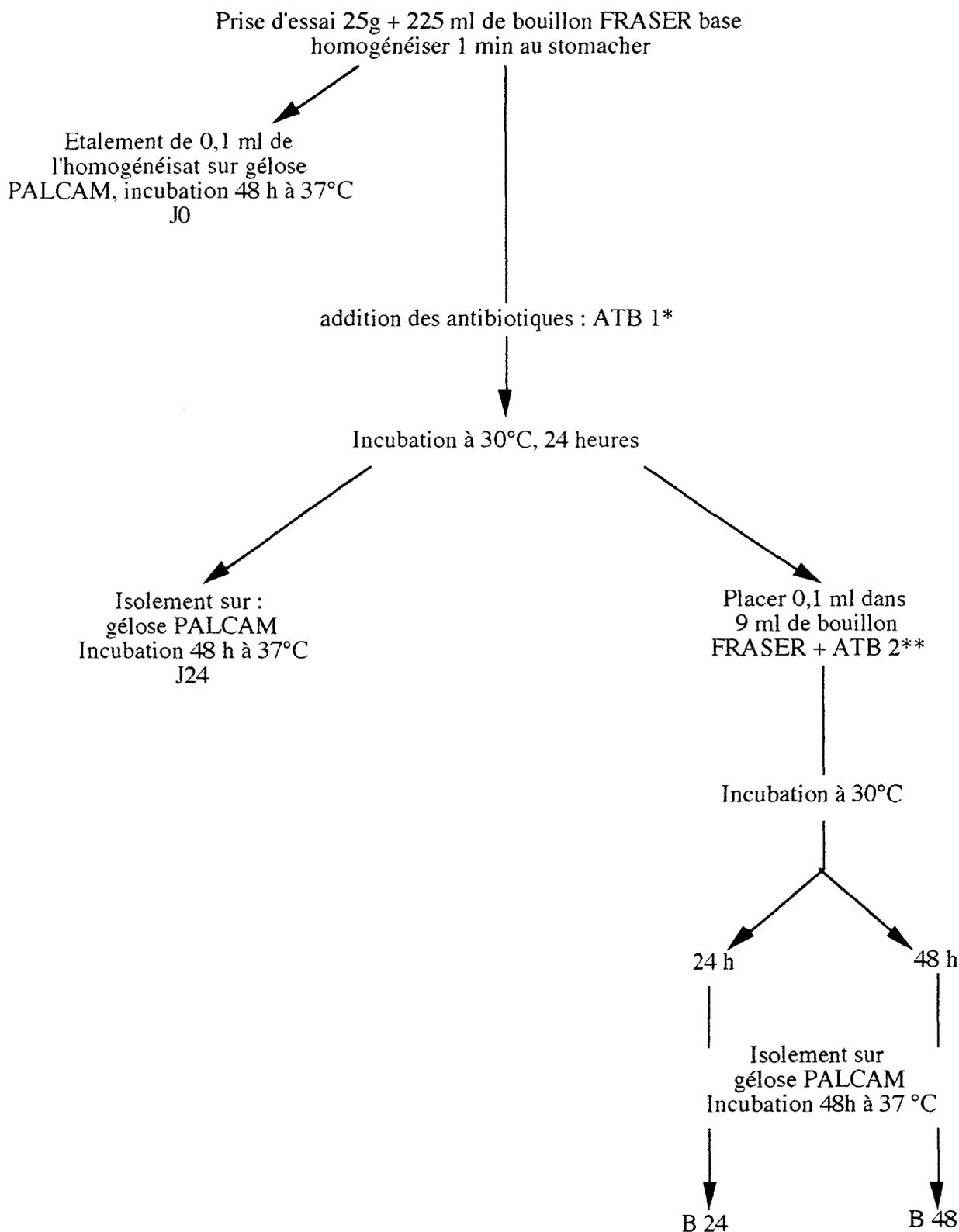


Fig 11 : Technique inspirée de la norme AFNOR V 08-055 utilisée au cours de notre étude.

J : enrichissement primaire B : enrichissement secondaire chiffre : temps d'incubation en heures

*ATB 1 : 10 mg / l d'acide nalidixique
12,5 mg / l d'acriflavine
0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

**ATB 2 : 20 mg / l d'acide nalidixique
25 mg / l d'acriflavine
0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal
3 g / l de LiCl

Pour avoir un recouvrement maximal des *Listeria* à Jo, la prise d'essai est diluée dans la base du Fraser sans les agents sélectifs (ATB 1) qui sont additionnés juste après le prélèvement de 0,1 ml nécessaire à l'étalement.

II. 1. 3. Identification des espèces de *Listeria*.

II. 1. 3. 1. Identification présomptive de *Listeria* .

L'examen des géloses PALCAM après 24 et 48 heures d'incubation peut révéler la présence de colonies suspectes. Sur gélose sélective PALCAM, les *Listeria* forment à 24 heures des colonies grises verdâtres luisantes, d'environ 1 mm de diamètre, entourées d'un halo noir. Après 48 heures d'incubation, les colonies typiques ont un diamètre d'environ 2 mm, sont incrustées dans la gélose et présentent une dépression centrale.

II. 1. 3. 2. Identification du genre et de l'espèce.

L'identification du genre et de l'espèce est à effectuer sur 5 colonies typiques, s'il y a moins de 5 colonies, les retenir toutes.

La technique classique consiste à purifier la colonie suspecte par isolement sur une gélose TSA, incubée 24 heures à 37°C. Les colonies de *Listeria* obtenues mesurent environ 1 mm de diamètre et sont translucides.

Des tests de confirmation du genre *Listeria* comme la réaction de la catalase et la coloration de GRAM permettent d'orienter l'identification vers le genre *Listeria*. (bacille GRAM positif, catalase positive).

L'utilisation de galeries miniaturisées : API *Listeria* permet de déterminer l'espèce.

II. 1. 3. 3. Test supplémentaire pour la confirmation de l'espèce *monocytogenes* : CAMP test (Schéma 4).

Ensemencer chacune des deux cultures de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* sur une gélose au sang de mouton défibriné de sorte à obtenir deux stries parallèles. Entre ces deux stries, ensemencer perpendiculairement la souche de *Listeria* à tester. La strie de *Listeria* et les les stries de *Staphylococcus* et de *Rhodococcus* sont séparées d'environ 1 à 2 mm. Plusieurs souches à tester peuvent être inoculées sur la même boîte ainsi que des souches témoins (positif et négatif) : *L. monocytogenes* et *L. innocua*.

Les géloses sont incubées 24 heures à 37°C.

La réaction est considérée comme positive s'il y a une augmentation de la zone de bêta hémolyse à l'intersection des stries de *Staphylococcus* ou *Rhodococcus* et de la souche à tester.

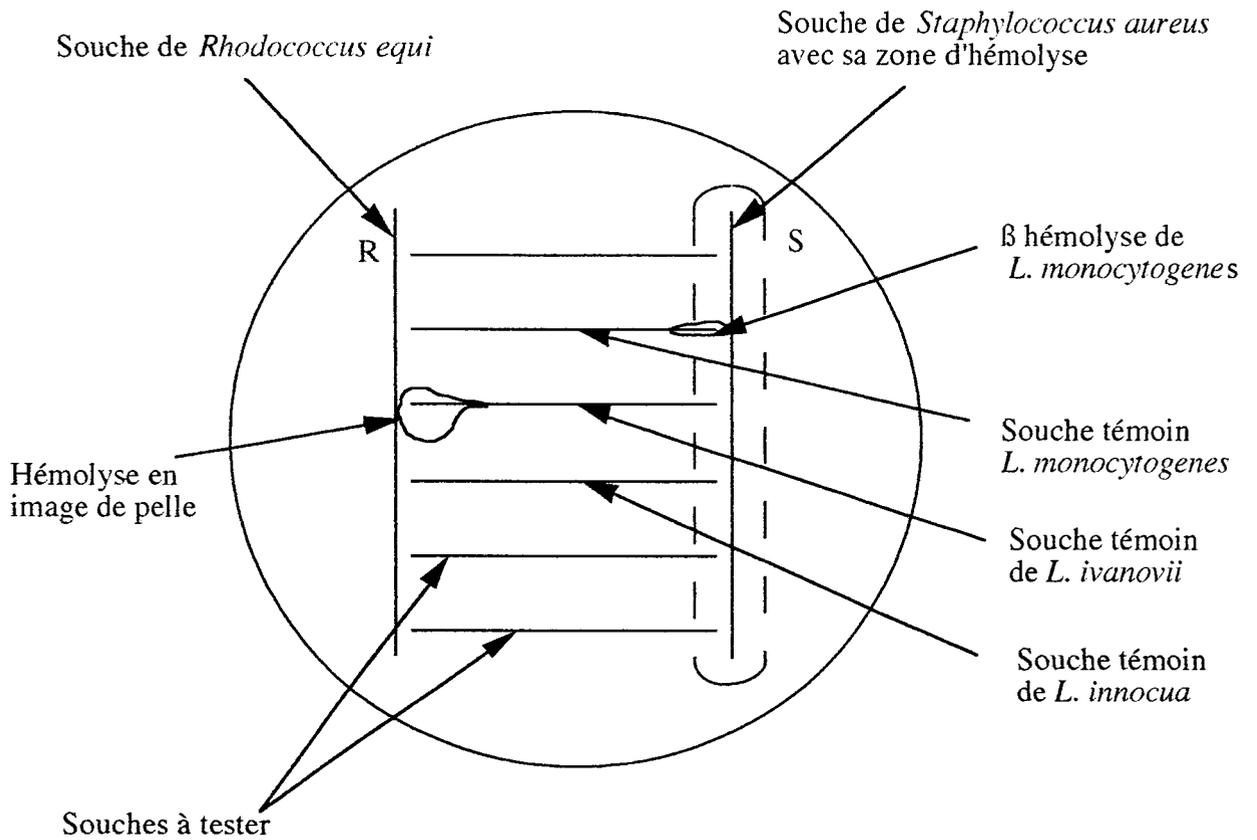


Schéma 4 : Test de CHRISTIE, ATKINS et MUNCH-PETERSEN (CAMP test).

L. monocytogenes présente une zone d' hémolyse arrondie du côté de la strie de *Staphylococcus aureus*. Une faible zone d' hémolyse peut également être rencontrée du côté de la strie *Staphylococcus* pour *L. seeligeri*.

Une zone d' hémolyse (image en pelle) du coté de la strie *Rhodococcus* est spécifique de *L. ivanovii*.

II. 2. ESSAIS IMMUNO-ENZYMATIQUES (EIA).

II. 2. 1. Techniques d'enrichissement pratiquées pour les tests immuno-enzymatiques.

Une étude comparative entre la méthode "IPL" et le kit TRANSIA a été réalisée sur différentes catégories d'aliments .

Le protocole d'enrichissement utilisé dans la détection des *Listeria* par le kit TRANSIA, peut varier selon la catégorie d'aliments. Pour les produits carnés et les produits de la mer, un enrichissement primaire de 24 heures à 28°C en UVM 1 (University of Vermont Medium) est préconisé. Les agents sélectifs de ce milieu sont : l'acide nalidixique 20 mg/l et l'acriflavine 12 mg/l. Ensuite une subculture est effectuée en milieu Fraser contenant de l'acide nalidixique 20 mg/l et de l'acriflavine 25 mg/l. Celui-ci est incubé 24 heures à 28°C.

Pour les produits laitiers et les légumes, un bouillon LEB (Merk) avec ses antibiotiques complété par un additif F3 fourni par la société TRANSIA est conseillé pour les enrichissements primaires et secondaires.

Pour les trois kits immuno-enzymatiques : TRANSIA, TECRA, VIDAS, employés sur des échantillons de saumons fumés un protocole général a été adopté (Fig 12).

Le kit VIDAS préconise un enrichissement primaire en LEB tamponné (Merk) pour les produits de la mer alors que le TRANSIA et le TECRA recommandent le bouillon UVM 1 (Annexe). Ces deux milieux ont été utilisés en parallèle pour l'enrichissement primaire.

L'enrichissement secondaire a été effectué dans le bouillon Fraser unanimement recommandé dans les trois kits. Les EIA sont réalisés sur les enrichissements secondaires préalablement inactivés par chauffage (100°C, 20 minutes) pour libérer les antigènes flagellaires.

II. 2. 2. Protocole de l'EIA du kit TRANSIA.

Cent µl des différents échantillons à analyser sont déposés dans les puits de la microplaque sensibilisés avec des anticorps monoclonaux anti *Listeria*. Cent µl d'anticorps conjugués à la peroxydase sont additionnés et reconnaissent les antigènes de *Listeria* contenus dans l'échantillon alimentaire, eux mêmes déjà complexés aux anticorps adsorbés sur la microplaque.

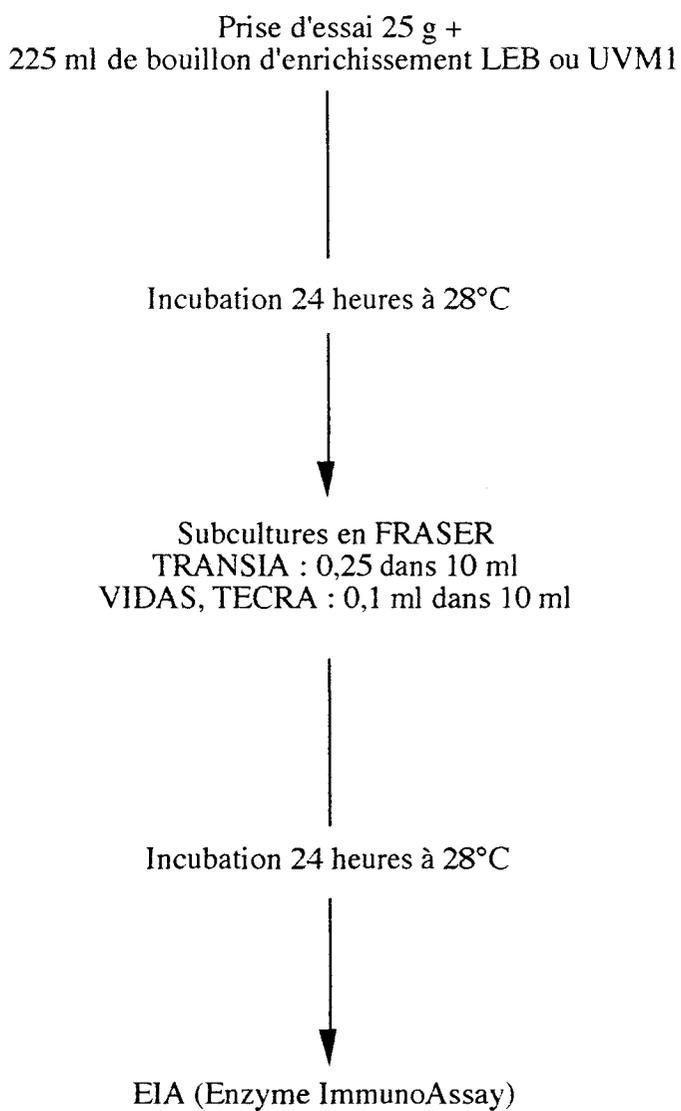


Fig 12 : Protocole d'enrichissement utilisé pour les EIA.

Après une heure d'incubation à température ambiante, cinq lavages successifs sont réalisés avec un tampon PBS (Annexe). Cent µl du mélange de substrat avec un volume égal de chromogène sont ajoutés pour développer la coloration en 30 minutes à température ambiante. La réaction enzymatique est stoppée par 50 µl de de solution d'arrêt.

Les densités optiques sont lues à une longueur d'onde de 450 nm. Des antigènes purifiés de *Listeria* spp et des antigènes d'une souche bactérienne n'appartenant pas à ce genre bactérien sont utilisés pour réaliser respectivement un témoin positif et négatif. La valeur moyenne de deux témoins négatifs est ajoutée à une densité optique de 0,150 pour déterminer la valeur seuil de positivité d'un échantillon.

Ce résultat est confirmé par un isolement de la subculture à partir de laquelle le kit a été effectué.

II. 2. 3. Protocole de l'EIA du kit TECRA.

Ce kit emploie une microplaque contenant des anticorps polyclonaux anti *Listeria* adsorbés dans chaque puits.

Un ml d'échantillon complété avec 50 µl de complément, permettant la solubilisation des antigènes, est thermisé à 100°C pendant 20 minutes. De ce mélange, 200 µl sont prélevés pour être placés dans un puits. La microplaque recouverte d'un parafilm est incubée 30 minutes à 37°C. Les éléments non fixés sont éliminés par trois lavages successifs.

200 µl de conjugué sont additionnés à chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à 37 °C quatre nouveaux lavages sont réalisés, avant l'addition de 200 µl de substrat. Une incubation à température ambiante de 15 à 30 minutes permet le développement de la coloration. La réaction enzymatique est stoppée avec 20 µl de solution d'arrêt.

L'interprétation des résultats peut se faire de façon visuelle avec un comparateur de couleur fourni avec le kit. Un lecteur de microplaque peut également être utilisé à une longueur d'onde de 414 +/- 10 nm.

Un échantillon est considéré positif si la densité optique est d'au moins 0,2, le témoin négatif ayant une densité inférieure à 0,2.

II. 2. 4. Protocole de l'EIA du kit VIDAS.

Le kit VIDAS, test qualitatif immuno-enzymatique détectant les antigènes de *Listeria* par fluorimétrie, fait appel à un système automatisé. Toutes les étapes sont réalisées automatiquement par le module analytique VIDAS qui analyse simultanément 6 à 12 échantillons en 45 minutes. Un cône à usage unique sensibilisé avec des anticorps monoclonaux anti *Listeria* sert à la fois de phase solide et de système de pipetage pour le test. Les autres réactifs nécessaires dans le déroulement de l'EIA sont prêts à l'emploi et sont pré-répartis dans une cartouche. Celle-ci composée de 10 puits est recouverte d'une feuille d'aluminium scellée et étiquetée avec un code-

barre. Le puits où l'échantillon est déposé est prédécoupé pour faciliter son introduction. Le dernier puits est une cuvette optique permettant la lecture en fluorimétrie.

Un aliquote du bouillon d'enrichissement secondaire thermisé est placé dans la cartouche et l'échantillon subit un cycle d'aspiration / refoulement. Les antigènes présents dans l'échantillon vont se fixer sur les anticorps monoclonaux anti-*Listeria* de l'intérieur du cône. Les éléments restés libres sont éliminés par lavage. Ensuite les anticorps conjugués marqués à la phosphatase alcaline sont aspirés / refoulés dans le cône et vont se fixer sur les antigènes de *Listeria* déjà complexés aux anticorps du support. Après des étapes de lavage, le substrat : 4-méthyl-ombélliféryl-phosphate est introduit dans le cône. L'enzyme fixée sur les paroi du cône catalyse la transformation du substrat en 4-méthyl-ombélliférone fluorescent. Le détecteur optique du VIDAS mesure l'intensité de la fluorescence à 450 nm. Les résultats analysés automatiquement par l'ordinateur fournissent une valeur test et une interprétation : positif, négatif.

II. 2. 5. Détermination des seuils de détection des différents kits immuno-enzymatiques.

A partir d'une culture pure de *L. monocytogenes* sérotype (4b), nous avons réalisé une suspension dense dans 10 ml de bouillon UVM. A partir de cette solution mère, une série de dilutions au dixième a été effectuée. Des numérations sur PALCAM ont permis d'établir le titre de la solution mère évalué à $1,14 \cdot 10^9$ UFC / ml

Les suspensions obtenues, titrant $1,14 \cdot 10^6$ à $1,14 \cdot 10^9$ UFC / ml ont été utilisées comme échantillon dans les trois kits immuno-enzymatiques pour évaluer leur seuil de détection.

II. 3. DETECTION DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* A L'AIDE DE SONDAS NUCLEIQUES.

II. 3. 1. Démarche suivie par le kit GENE TRAK *Listeria monocytogenes*.

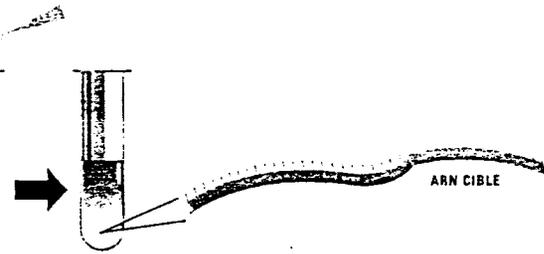
Le kit de diagnostic rapide de *Listeria monocytogenes* par hybridation moléculaire reconnaît l'ARN r 16 S comme matrice cible.

Après une incubation de 24 heures à 35°C dans un bouillon UVM II (Annexe) des échantillons de saumons fumés, l'enrichissement est étalé à l'aide d'un écouvillon sur gélose Oxford. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la culture récupérée sur la boîte de Petri avec un écouvillon est transférée dans 0,75 ml d'une solution saline phosphate-tamponné (PBS Annexe).

La Fig 13 récapitule les différentes étapes intervenant dans l'analyse.

PRINCIPE GENE-TRAK® DE DETECTION PAR HYBRIDATION

Fig 13 : Schéma récapitulatif des différentes étapes intervenant au cours du kit GENE TRAK.



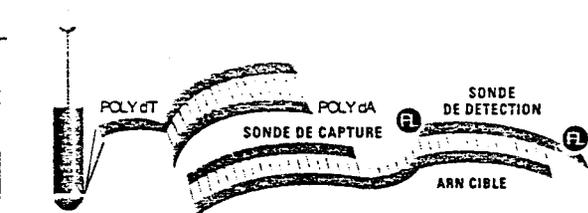
1 PRÉPARATION DE L'ECHANTILLON

1 Ajouter la solution de lyse dans le tube et incuber pour libérer l'ARNr cible.



2 HYBRIDATION

2 Ajouter la solution de sonde et incuber. Les sondes ADN s'hybrident sur l'ARNr cible.



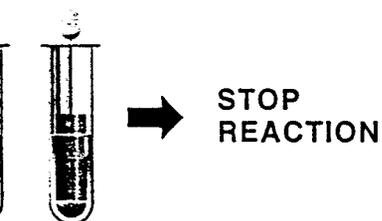
3 CAPTURE DE L'HYBRIDE

3 Placer les dipsticks dans les tubes et incuber. La sonde de capture s'hybride sur le Poly T des dipsticks.



4 MARQUAGE ENZYMATIQUE

4 Laver les dipsticks, les placer dans des tubes contenant l'enzyme conjugué et incuber.



5 DÉVELOPPEMENT DE LA COULEUR

5 Laver les dipsticks et les placer dans des tubes contenant le substrat-chromogène. Incuber pour le développement de la couleur. Retirer les dipsticks. Ajouter la solution Stop aux tubes.



6 DETECTION

6 Lire l'absorbance à 450 nm à l'aide du spectrophotomètre Gene-Trak®.

FL : Fluorescéine.

HRP : Horse Radish Peroxidase.

Lyse bactérienne :

De cette suspension dense, 0,5 ml sont prélevés pour effectuer la lyse des bactéries. Les cellules sont tout d'abord mises en présence de 0,1 ml de réactif de prétraitement contenant du lysozyme digérant partiellement la paroi de la cellule et la membrane. Cette étape se déroule à 37°C pendant 15 minutes. La couleur de la solution est violette.

La lyse proprement dite est réalisée à 37°C, 15 minutes par addition de 0,1 ml de réactif de lyse. La couleur de la solution doit être verte.

Hybridation :

Le traitement de l'échantillon se poursuit par l'ajout de 0,1 ml de sondes spécifiques de *Listeria* et la mise en place des supports de la sonde capture (dipsticks). L'ensemble du système est incubé 1 heure à 65°. La coloration de la solution est rouge.

Pour chaque test, deux sondes sont utilisées chacune ayant une fonction distincte. Les deux sondes sont homologues à deux séquences spécifiques d'un RNA ribosomique cible. Les sondes s'hybrident sur des régions adjacentes de la même molécule de RNA ribosomique.

Capture de l'hybride :

La sonde capture, contenant une queue poly A (Acide polydéoxyadénylique) du côté 3' de la sonde, autorise la capture des molécules hybrides formées, par l'intermédiaire d'un support solide (Dipstick) enduit de poly T (Acide polydésoxythimidylique) : molécule homologue du poly A. Ainsi, le poly T s'hybride avec la queue poly A de la sonde de capture, entraîne avec elle l'hybride formé du r RNA et des deux sondes spécifiques.

Détection :

Le principe de détection est le même que celui intervenant dans les essais immuno-enzymatiques. Après lavages dans une solution à 65°C puis une solution à température ambiante, le complexe hybride capturé sur le dipstick est mis en contact avec 0,75 ml de l'anticorps antifuoresceïne conjugué à l'HRP (horseradish peroxydase). L'anticorps antifuoresceïne se lie à la fluoresceïne présente sur la sonde de détection. Cette réaction est développée pendant 20 minutes à température ambiante.

Le complexe résultant est mis en présence de 0,75 ml du mélange : substrat de l' HRP et du chromogène (benzidine produisant une couleur bleue), pendant 30 minutes à température ambiante.

La réaction enzymatique est stoppée par addition de 0,25 ml d'acide sulfurique produisant un changement de couleur (de bleu à jaune).

L'absorption mesurée à 450 nm est proportionnelle à la quantité de conjugué antifuoresceïne HRP lié à l'hybride. La détermination des valeurs d'absorption des échantillons se fait par rapport à un témoin négatif. Une valeur d'absorption inférieure à 0,10 indique l'absence de

Listeria alors qu'une valeur supérieure à 0,10 indique la présence de *Listeria* dans l'échantillon testé.

Pour les échantillon positifs, le résultat peut être confirmé à partir de la culture sur gélose OXFORD. Cependant, il est plus aisé de repartir d'un isolement du bouillon d'enrichissement celui-ci permettant d'obtenir des colonies isolées.

II. 3. 2. Démarche suivie par le kit GEN PROBE *Listeria monocytogenes*.

Le test d'identification Accuprobe de GEN PROBE utilise une sonde d'ADN constituée d'un simple brin, complémentaire d'une séquence de l'ARN ribosomal 16 S spécifique de *L. monocytogenes*. La détection de *L. monocytogenes* peut se faire à partir d'un bouillon d'enrichissement de 48 heures à 30°C en LEB ou TSB.

Une deuxième méthode consiste à prélever des colonies après isolement d'un milieu d'enrichissement sur milieu solide. L'utilisation d'un enrichissement en bouillon Fraser ou UVM impose ce passage en milieu solide. Ainsi peuvent être testées les colonies cultivées sur gélose sang (5% sang de mouton), OXFORD, PALCAM. Une seule colonie est suffisante pour réaliser le test.

La méthodologie du test comporte 4 étapes représentées Fig 14 .

* Lyse des bactéries.

L'échantillon à tester est placé dans un tube où se trouve sous forme lyophilisée la sonde de marquage. La lyse des bactéries est obtenue après 5 minutes de contact à 37°C avec le réactif de lyse (composition inconnue) pour un échantillon prélevé sous forme de colonie et un contact de 10 minutes pour un échantillon sous forme bouillon .

* Hybridation.

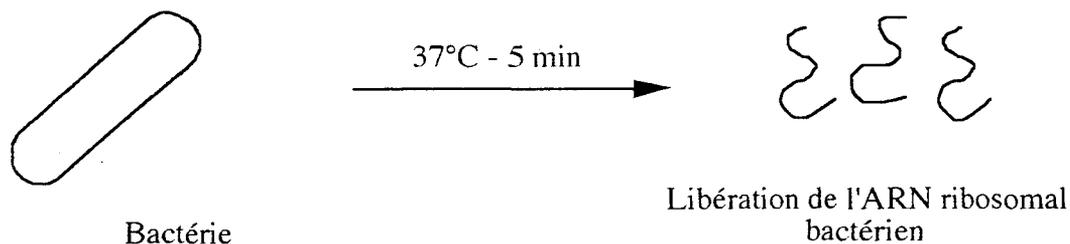
Les sondes marquées à l'ester d'acridinium sont réhydratées dans le liquide de lyse et en présence de l'ARN ribosomal cible, libéré au cours de la lyse, se forme un hybride ARN/ADN stable. L'efficacité de l'hybridation est dépendante de la température et de la durée d'incubation. Cette réaction est réalisée à 60°C pendant 15 minutes.

* Sélection des hybrides.

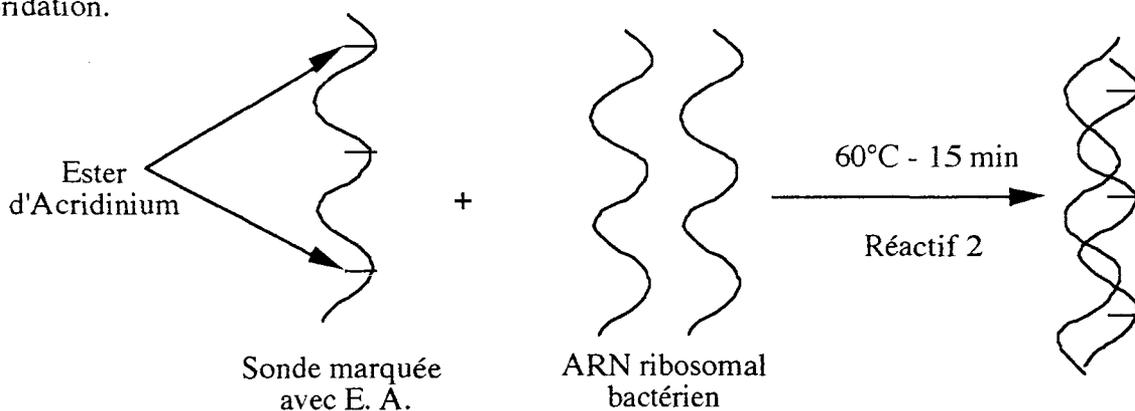
L'addition du réactif de sélection permet d'hydrolyser l'ester d'acridinium non protégé par la formation d'un hybride. Seuls les brins ADN engagés dans un complexe ARN/ADN gardent leur marquage. Cette étape très sensible à la température et à la durée d'incubation se déroule à 60°C pendant 3 minutes.

Fig 14 : Schéma récapitulatif des différentes étapes intervenant dans le kit GEN PROBE.

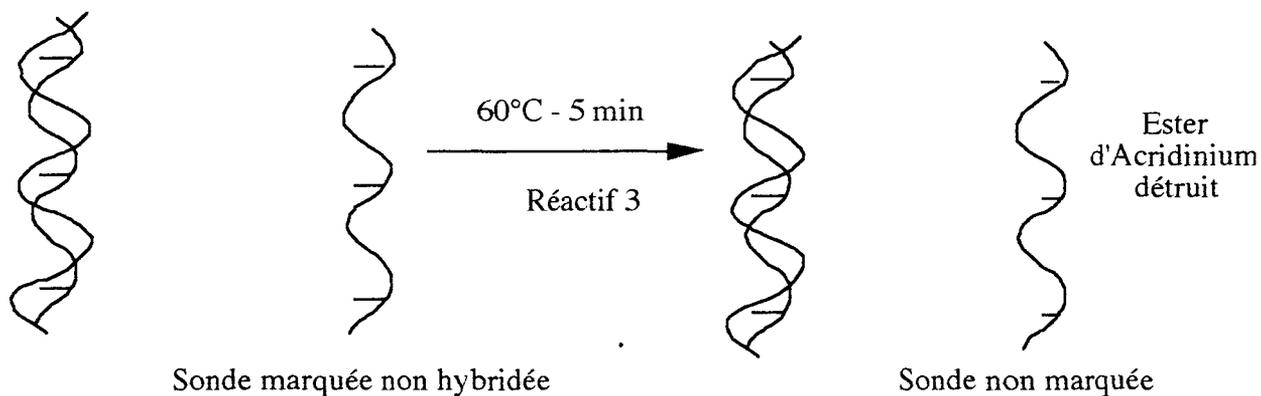
1. Lyse des Bactéries



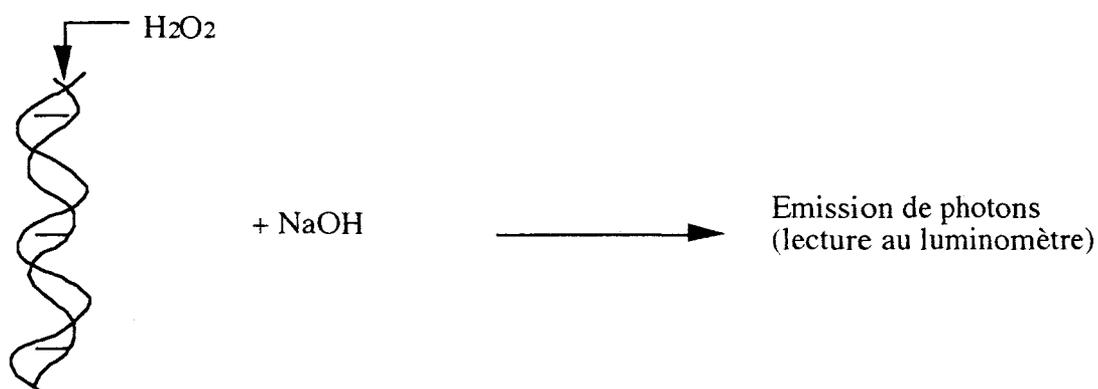
2. Hybridation.



3. Destruction de l'Ester d'Acridinium sur les sondes non hybridées.



4. Détection par luminescence.



* Détection.

L'addition d'une solution d'H₂O₂ initie, en milieu alcalin, la réaction de luminescence par rupture de la molécule d'acridinium. Cette réaction est totale et très rapide (inférieure à 2 secondes). Les photons émis sont captés par le tube photomultiplicateur du luminomètre et sont convertis en un signal digital. La quantité de lumière produite est proportionnelle à la quantité d'ARN ribosomal contenu dans le tube.

La valeur seuil établie par le fabricant est de 50 000 RLU (Relativ Luminescens Unit).

Les échantillons produisant un signal > 50 000 RLU sont considérés comme positifs et les signaux < à 50 000 RLU sont considérés comme négatifs.

II. 4. REVIVIFICATION DES BACTERIES STRESSEES.

II. 4. 1. Application d'un stress thermique à une population de *Listeria*.

Pour déterminer le temps de revivification nécessaire à température ambiante, avant l'addition des antibiotiques responsables de la sélectivité de l'enrichissement, nous avons appliqué un stress à une population bactérienne.

Le stress le plus aisé à reproduire et qui a déjà été utilisé pour *L. monocytogenes* est le traitement thermique (BUSCH et DONELLY 1992).

Sur une culture pure de *Listeria* à 10⁷ UFC / ml, nous avons pratiqué un traitement thermique de 50 minutes à 55°C. Les souches utilisées dans cette étude sont : *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *L. monocytogenes* 1/2b CLIP 12499 et *L. innocua* 6b ATCC 33091.

Un dénombrement de la population sur un milieu neutre : TSA, nous permet d'évaluer l'ensemble de la population (cellules en bon état physiologique et cellules stressées). Par contre, un dénombrement sur PALCAM, milieu sélectif par la présence de LiCl et d'antibiotiques, reflète le nombre de bactéries en bon état physiologique.

Un prélèvement réalisé toutes les 10 minutes a permis, par dénombrement sur ces deux milieux, de suivre l'évolution de la population *Listeria* au cours du stress.

II. 4. 2. Mise en place d'une étape de revivification.

Après traitement thermique de 50 minutes, ces cellules sont reprises dans la base Fraser à raison de 25 ml de culture pour 225 ml de milieu, pour subir une revivification de 6 heures à 20°C. Un prélèvement réalisé toutes les heures nous permet d'estimer l'effet de la revivification par dénombrement sur milieu neutre et sur milieu sélectif.

Parallèlement, l'évolution d'une population non stressée est réalisée en base Fraser pour évaluer le temps de latence avant multiplication des bactéries. Ce temps ne devra pas être dépassé au cours de l'étape de revivification sous peine de fausser le dénombrement direct réalisé dans une analyse.

II. 4. 3. Revivification appliquée à l'étude d'échantillons de saumon fumé.

Au cours du suivi de saumons fumés, fabriqués par l'IFREMER dans des conditions les plus aseptiques possibles et à partir d'une matière première sélectionnée, nous avons appliqué une étape de revivification avant dénombrement. La faible charge initiale en micro-organismes de ces produits nous a permis de suivre l'évolution d'une population de *Listeria* inoculée artificiellement sur PALCAM comme sur gélose neutre TSA, afin de déterminer le temps de revivification applicable au saumon fumé sans risque de multiplication.

III. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE *LISTERIA* DANS LE SAUMON FUME.

III. 1. REALISATION DU PLAN D'EXPERIENCES ET MODELISATION.

III. 1. 1. Fabrication du milieu de culture support du plan expérimental *Listeria* Enrichment Broth (LEB).

Le milieu LEB a été préparé à partir d'un déshydraté (Merk ref : 11951)

Sa composition est la suivante :

hydrolysate tryptique de caseïne	17 g
Peptone soja	3 g
NaCl	5 g
phosphate de potassium	2,5 g
Glucose	2,5 g
Extrait de levure	6 g
eau distillée QSP	1 litre

pH 7,2 +/- 0,2

Le taux de sel, variable en fonction des traitements étudiés, a été ajusté par l'addition de NaCl, après dissolution du déshydraté dans l'eau .

Ainsi pour obtenir le taux de sel désiré, NaCl a été additionné à raison de

15 g pour un taux de sel final de 2%

25 g pour un taux de sel final de 3%

35 g pour un taux de sel final de 4%.

Le milieu a été stérilisé ensuite à 120°C pendant 20 minutes.

L'ajustement du taux de phénol a été réalisé sur le milieu autoclavé, par addition de fumée liquide (LUTETIA JAEGER : formule fermée) fournie par Mr KNOKAERT de l'IFREMER Nantes.

Le dosage des phénols contenus dans cette fumée liquide a révélé un taux de 302 mg de phénol / 100 ml.

Par calcul nous avons déterminé la quantité de fumée liquide à ajouter pour obtenir le taux de phénol désiré soit :

156 μ l de fumée liquide	0,5 mg / 100 ml
390 μ l de fumée liquide	1,25 mg / 100ml
625 μ l de fumée liquide	2 mg / 100 ml

L'addition de fumée liquide, très acide, a provoqué une variation du pH. Celui-ci a été ajusté stérilement à 6,2 à l'aide de NaOH et de H₂SO₄ stériles.

III. 1. 2. Dosage du NaCl.

III. 1. 2. 1. Principe.

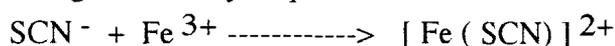
Le dosage du sel a été réalisé par la méthode de Charpentier - Volhard (dosage par reste). En présence d'un excès de nitrate d'argent, les chlorures sont précipités à l'état de chlorures d'argent .



L'excès de nitrate d'argent est dosé par une solution de thiocyanate de potassium :



L'indicateur de fin de réaction est l'alun de fer et d'ammonium qui forme avec le thiocyanate un complexe rouge ferrithiocyanique.



III. 1. 2. 2. Mode opératoire.

Dans un erlen de 250 ml, introduire :

- * E = prise d'essai
- * E1 = 10 ml de solution de nitrate d'argent de concentration 0,1 M en Ag +
- * 10 ml acide nitrique

Agiter et maintenir une douce ébullition jusqu'à clarification du surnageant (15 minutes).

Laisser refroidir et ajouter 50 ml d'eau distillée et 2 à 3 ml de solution d'alun de fer et d'ammonium.

Titrer par la solution de thiocyanate de potassium voisine de 0,1 M jusqu'à l'obtention d'une teinte chamois.

Soit V1 ml le volume de thiocyanate additionné.

Titration de la solution de thiocyanate.

- * E2 = 10 ml de solution de nitrate d'argent
- * 50 ml d'eau distillée
- * 10 ml d'acide nitrique
- * 2 à 3 ml de solution d'alun de fer et d'ammonium.

Doser par la solution de thiocyanate.

Soit V2 ml le volume de thiocyanate additionné.

Titre de la solution de thiocyanate = $E2 \times 0,1 / V2$

Les résultats du dosage de sel, sont exprimés en grammes de chlorures de sodium par litre de solution.

$$\text{NaCl en g/l} = \frac{T \text{ Ag}}{E} \left(E1 - E2 \frac{V1}{V2} \right) \times 58,5$$

Ce dosage de sel est réalisé directement sur les milieux utilisés pour le plan d'expériences. Par contre le dosage du sel dans les saumons fumés nécessite une mise en solution des ions chlorures selon la technique suivante :

- peser 2 g d'échantillon, ajouter 100ml d'eau et broyer à l'ultra-turrax
- rincer la tige avec de l'eau de façon à obtenir de 150 à 180 ml de solution
- porter à ébullition pendant 10 minutes et laisser refroidir
- filtrer la solution sur laine de verre et ajuster le volume à 200 ml;

- le dosage des ions chlorures est réalisé sur cette préparation.

III. 1. 3. Dosage des phénols.

Cette méthode s'applique à l'ensemble des produits de la mer fumés et permet d'évaluer l'intensité du fumage.

III. 1. 3. 1. Principe.

En présence de ferricyanure et en milieu alcalin, les composés phénoliques développent une coloration avec l' amino 4 antipyrine. La quantification du composé coloré formé se fait après extraction chloroformique par spectrophotométrie.

III. 1. 3. 2. Réactifs.

Tous les réactifs doivent être de qualité analytique.

- Ethanol à 95 %
- Solution d'ammoniaque 2N (1 volume $\text{NH}_4 \text{OH}$ 28 % + 8 volumes H_2O)
- Solution aqueuse d' aminoantipyrine à 2 % (m/v) : l' amino 4 antipyrine (phényl - 1, diméthyl - 2, 3 amino 4 pyrazolone - 5) solide doit être conservée à l'abri de l'air et de l'humidité.

La solution doit être préparée extemporanément.

- Solution de ferricyanure de potassium à 2 %, à préparer extemporanément
- chloroforme
- sulfate anhydre
- Phénol : solution étalon à 0,5 g/l et à 0,005 g/l, le titre de la solution étalon est vérifiée par la méthode iodométrique au bromate (Annexe).

III. 1. 3. 3. Mode opératoire.

* Prise d'essai et extraction.

Dans un tube à centrifuger, peser 5 g +/- 0,001 g d'un échantillon représentatif de 200 g au minimum. Ajouter 25 ml d'éthanol à 95°, homogénéiser à l'ultra-turrax. Rincer la tige avec environ 5 ml d'éthanol et verser dans le tube .

Centrifuger dix minutes à 2500 tours / minutes.

Recueillir le surnageant dans une fiole de 50 ml

Remettre le culot en suspension dans 10 ml d'alcool. et centrifuger de nouveau, puis recueillir la phase alcoolique dans la fiole

Compléter à 50 ml avec de l'éthanol.

* Dosage et gamme étalon :

Mettre dans une ampoule à décanter en respectant l'ordre suivant :

	ESSAI (ml)		GAMME ETALON (ml)			
Extrait alcoolique	5					
Solution étalon de phénol (5 mg/l)		0	2	4	6	10
Eau	30	35	33	31	29	25
Amino antipyrine	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Ammoniaque 2N	2	2	2	2	2	2
Ferricyanure de K	2	2	2	2	2	2
Chloroforme	10	10	10	10	10	10
Quantité de phénol contenue dans chaque ampoule	C	0	10 μ g	20 μ g	30 μ g	50 μ g

Agiter énergiquement et reprendre la phase chloroformique (la plus dense) sur un entonnoir garni d'un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau.

Lire la densité optique du filtrat obtenu à 455 nm. Le zéro est réalisé sur le zéro de la gamme étalon.

Effectuer deux déterminations sur le même échantillon préparé.

L'extraction des phénols par une solution alcoolique préconisée dans cette méthode n'est pas nécessaire dans le cas du dosage des phénols de notre milieu de culture.

* expression des résultats :

La droite d'étalonnage permet d'exprimer la quantité de phénol contenue dans l'ampoule à décanter (C en μ g) en fonction de l'absorbance, l'équation est du type : $C = k \times \text{Abs} + b$
la quantité de phénol P exprimée en mg pour 100 g d'échantillon est la suivante :

$$P = C \times 10^{-3} \times 50 / 5 \times 100 / 5$$

Les résultats des essais réalisés en double par le même opérateur ne doivent pas différer de plus de 5% de la moyenne des deux résultats.

III. 1. 4. Inoculation du milieu de culture.

La souche choisie pour réaliser le plan expérimental est une souche de collection : *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115. La subculture utilisée pour l'inoculation du milieu a été préparée de la façon suivante. Une colonie de la souche repiquée sur TSA a été prélevée et placée dans 10 ml de LEB puis incubée 24 heures à 30°C.

Afin d'éviter un choc thermique au moment de l'inoculation du milieu, préalablement placé aux températures étudiées à savoir 4, 8 ou 12°C, la suspension mère diluée à 10^{-3} a été placée 1 heure à la température de l'incubation choisie. Puis, 95 ml de milieu ont été inoculés avec 1 ml de la suspension diluée à 10^{-3} .

III. 1. 5. Suivi de l'évolution de la population *Listeria*.

L'évolution de la population *Listeria*, dans les différentes conditions déterminées par le plan expérimental, a été suivie par étalement de 0,1 ml de milieu de culture sur géloses PALCAM prélevé au cours des 35 jours d'incubation des milieux. Pour s'assurer de la reproductibilité des résultats, le traitement 18 représentant le point central a fait l'objet de 3 répétitions et les traitements 1, 4, 6, 8, 27 choisis arbitrairement ont été étudiés en double.

III. 1. 6. Analyse statistique.

Les données expérimentales ont été analysées par régression non linéaire assistée par ordinateur à l'aide du logiciel Splus. Les paramètres de régression ont été estimés par le critère du maximum de vraisemblance. Le test des termes significatifs et la sélection de ceux-ci pour l'ajustement du modèle ont été déterminés par le test du χ^2 . L'algorithme Gauss - Marquardt a été utilisé pour le traitement numérique.

III. 2. VALIDATION DU MODELE SUR SAUMON FUME : REALISATION DE CHALLENGE - TESTS.

III. 2. 1. Préparation des saumons fumés.

Les challenge - tests ont été réalisés sur des saumons fumés préparés par l'IFREMER à notre demande et selon des critères définis.

Pour répondre aux besoins de l'expérimentation des taux de NaCl de 2, 3, 4 % et des taux de phénol de 0,5, 1,25 et 2 mg / 100g ont été choisis.

Sur des filets frais de saumon d'environ 1 kilo, les différentes étapes de transformation, résumées dans le Tableau VIII, ont été réalisées.

Étapes du process	Critères souhaités	Conditions d'obtention
Filetage		
Parage		
Lavage à l'eau du robinet		
	2 %	3 heures de contact
Salage au sel sec	3%	4H 30 de contact
	4%	6 H de contact
Repos une nuit en chambre froide à 4°C		
Séchage 1H à 25 °C, à 60 % d'humidité		
Fumage à 24 °C et 65 % d'humidité	0,5 mg /100 g	2 H 30
	1,25 mg /100 g	3 H 30
	2 mg /100 g	4 H 30
Conditionnement sous vide des filets entiers		

Tableau VIII : Préparation des saumons fumés ; les caractéristiques des différentes étapes de transformation.

III. 2. 2. Déroulement des challenge - tests

Les filets de saumons fumés conservés et acheminés sous forme congelée ont été décongelés une nuit à 4°C. Afin de limiter l'hétérogénéité des critères physico - chimiques (taux de sel et de phénols) dans le filet de saumon fumé, celui - ci a été prélevé sans la peau, puis broyé à l'aide d'un homogénéiseur (Homogenizer 1094 Tecator).

Des prélèvements de 25 g ont été placés dans des sachets de conditionnement (en polyamide-polyéthylène 20/70, BOURDEAU, St Etienne de Montluc) pour inoculation avant d'être scellés.

Dans un premier temps, la souche *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 a été inoculée dans une série de challenge - tests.

Pour évaluer l'influence de la souche sur les résultats, un mélange de trois souches : *L. innocua* 6b ATCC 33091, *L. monocytogenes* 1/2 b CLIP 12499 et une *L. monocytogenes* isolée de saumon fumé (non sérotypée) a été également utilisée.

L'inoculation, à un taux de 10^4 ou 10^2 B / g, a été réalisée selon les modalités décrites précédemment pour les milieux liquides.

Les échantillons ainsi obtenus sont homogénéisés au stomacher puis conditionnés sous vide à l'aide d'un multivac A 300. La durée du temps pour faire le vide est réglée à l'aide du potentiomètre " vide " sur la position 5. Le vide est réalisé jusqu'à - 1000 mbar. ?

Les échantillons sont ensuite placés à la température de 4 , 8 ou 12°C selon le traitement choisi. L'évolution de *Listeria* dans ces produits est suivie au cours des 35 jours de stockage par dénombrement sur gélose PALCAM, après dilution de l'échantillon par 225 ml de base Fraser.

RESULTATS et DISCUSSION

I. ACQUISITION DE DONNEES MICROBIOLOGIQUES DANS LE SAUMON EN COURS DE TRANSFORMATION.

Listeria est un germe ubiquitaire largement répandu dans l'environnement (terre, végétaux, boues, stations d'épuration, matières fécales...). Son caractère psychrotrophe, ses propriétés d'attachement, sa résistance au sel, à la dessiccation, la faible aw jusqu'à laquelle elle peut se développer, sont autant de facteurs qui lui permettent de s'implanter très facilement dans les ateliers de transformation. De nombreuses études ont montré la contamination des aliments et aucune catégorie alimentaire n'est épargnée (MC GOWAN *et al.* 1994, CATTEAU 1994). Mais dans la majorité des cas, le nombre de *L. monocytogenes* est faible de l'ordre de 100 à quelques centaines par gramme.

Notre étude portant sur les quatre catégories alimentaires majoritaires : produits carnés, laitiers, végétaux et produits de la mer, a été réalisée en 1992 avec la méthode IPL et en 1993 avec la méthode AFNOR. Celle-ci permet de classer les produits de la mer au deuxième rang, après les produits carnés, de la plus forte incidence rencontrée en *Listeria*, Tableau IX. Ces résultats se maintiennent d'une année à l'autre malgré le passage de la méthode IPL à la méthode AFNOR.

Avec plus de 45 % d'échantillons positifs pour la présence en *Listeria*, dont 16 à 21 % positifs pour l'espèce *monocytogenes*, les produits de la mer présentent un risque potentiel pour la santé publique.

Une analyse plus ciblée dans la catégorie des produits de la mer a été effectuée sur des échantillons de saumons fumés.

I .1. ETUDE DE L'INCIDENCE DE *LISTERIA* DANS LE SAUMON FUME DU COMMERCE.

Pour réaliser cette étude, nous avons choisi des saumons fumés de différentes origines. Les produits disponibles dans le commerce nous ont permis d'analyser, selon la méthode "IPL", du saumon de Norvège, d'Irlande, d'Ecosse et du Pacifique. Au total, 38 échantillons ont été testés, Tableau X.

Le fort taux d'échantillons positifs en *Listeria monocytogenes* cité précédemment se confirme pour les saumons fumés avec 21 %. Par contre, l'incidence du genre *Listeria*, toutes espèces confondues est plus élevée avec 76%. Le nombre de *Listeria* reste faible cependant (inférieur à 100 *Listeria* / g). En général, il faut un enrichissement d'au moins 24 heures pour les mettre en évidence. Une valeur maximale de 31% a été rapportée par FARBER en 1991 et une valeur minimale de 10% a été rapportée par JEMMI en 1993 (cf Tableau XI) ; nos résultats représentent donc des valeurs intermédiaires.

Catégories d'aliments	Etude réalisée en 1992 avec la technique IPL			Etude réalisée en 1993 avec la méthode AFNOR V08-055		
	nb d'échantillons	nb d'échantillons positifs (%)	Espèces (%)	nb d'échantillons	nb d'échantillons positifs (%)	Espèces (%)
Produits carnés	40	25 (62 %)	<i>L. innocua</i> (27,5 %)	58	40 (68%)	<i>L. innocua</i> (15,5%)
			<i>L. monocytogenes</i> (25 %)			<i>L. monocytogenes</i> (37,9 %)
			<i>L. welshimeri</i> (10 %)			<i>L. welshimeri</i> (13,5%)
Produits laitiers	49	13 (26 %)	<i>L. innocua</i> (4 %)	62	21 (33,8 %)	<i>L. innocua</i> (21%)
			<i>L. monocytogenes</i> (22 %)			<i>L. monocytogenes</i> (9,6%)
Produits végétaux	60	6 (10 %)	<i>L. innocua</i> (1,6 %)	37	6 (16%)	<i>L. innocua</i> (10,8%)
			<i>L. monocytogenes</i> (1,6 %)			<i>L. monocytogenes</i> (5,4%)
			<i>L. seeligeri</i> (6 %)			
Produits de la mer	42	20 (47 %)	<i>L. innocua</i> (21,4 %)	47	21 (44,6 %)	<i>L. innocua</i> (10,6%)
			<i>L. monocytogenes</i> (16,6 %)			<i>L. monocytogenes</i> (21,2%)
			<i>L. seeligeri</i> (2,38 %)			<i>L. seeligeri</i> (12,7%)
			<i>L. welshimeri</i> (7,14 %)			
Total	191	64 (33,5 %)	<i>L. innocua</i> (12 %)	204	88 (43 %)	<i>L. innocua</i> (15 %)
			<i>L. monocytogenes</i> (15 %)			<i>L. monocytogenes</i> (19,6%)
			<i>L. seeligeri</i> (3,6 %)			<i>L. seeligeri</i> (3,4%)
			<i>L. welshimeri</i> (2,6 %)			<i>L. welshimeri</i> (5,8%)

Tableau IX : Incidence de *Listeria* dans les différentes catégories d'aliments.

Origine du saumon	Nombre d'échantillons	Nb échantillons positifs (%)	Espèces en (%)	
Pacifique	5	4 (80 %)	<i>L. seeligeri</i>	(20 %)
			<i>L. innocua</i>	(20 %)
			<i>L. monocytogenes</i>	(40 %)
Norvège	16	1 (68,7 %)	<i>L. innocua</i>	(62,5 %)
			<i>L. monocytogenes</i>	(6,2 %)
Ecosse	12	10 (83,3 %)	<i>L. innocua</i>	(58,3 %)
			<i>L. monocytogenes</i>	(25 %)
Irlande	3	3 (100 %)	<i>L. innocua</i>	(66 %)
			<i>L. monocytogenes</i>	(33 %)
Non déterminée (traiteur)	2	1 (50 %)	<i>L. monocytogenes</i>	(50 %)
Total	38	29 (76%)	<i>L. seeligeri</i>	(2,6 %)
			<i>L. innocua</i>	(52,6 %)
			<i>L. monocytogenes</i>	(21 %)

Tableau X : Incidence de *Listeria* dans le saumon fumé du commerce.

Références bibliographiques	Nombre d'échantillons	Nombre d'échantillons positifs	% de <i>Listeria monocytogenes</i>	% de <i>Listeria spp</i>
JEMMI 1993 (Suisse)	388	33	10%	
FUCHS <i>et al.</i> 1994 (UK)	22	3	13,6	
FARBER 1991 (USA)	32	10	31%	
DILLON <i>et al.</i> 1992 (Canada)	12	0		0
HARTEMINK 1991 (Islande)	13	3		23%
RORVIK <i>et al.</i> 1995 (Norvège)	65	7	11%	

Tableau XI : Incidence de *Listeria* dans le saumon fumé rapportée dans la bibliographie.

La présence de *L. monocytogenes* dans les produits de la mer, notamment les saumons fumés est un fait aujourd'hui bien établi, mais nous ne disposons que peu d'informations sur l'origine de la contamination en *Listeria* au cours du procédé de transformation. Dans le but de recueillir des renseignements sur la présence ou l'absence de cette bactérie, sur l'étendue de la contamination, l'origine aléatoire ou systématique de l'apparition de la contamination, nous avons entrepris des suivis de lignes.

I. 2. Etude de deux lignes de production de saumon fumé.

Deux suivis de lignes ont été réalisés avec l'accord et la participation de deux industriels producteurs de saumons fumés. Les industriels ont eux mêmes déterminé le type de ligne à étudier. Leur choix s'est porté sur une ligne comportant un salage par injection. Celui-ci reflète l'importance de ce type de technologie par rapport à l'ensemble de l'activité des deux entreprises. Les résultats sont rapportés dans les Tableaux XII et XIII.

Les échantillons se sont révélés négatifs pour la recherche de *Listeria* jusqu'au stade du conditionnement dans le site N°1, alors que pour le site N° 2 la contamination apparaît dès l'étape du salage.

Pour les deux entreprises, les matières premières examinées se sont révélées négatives. Cependant le nombre d'échantillons analysés est trop faible pour être confronté aux résultats positifs rapportés dans la bibliographie (JOUVE 1993, JEMMI 1993, RORVIK 1995). EKLUND *et al.* (1995) rapportent que l'extérieur du poisson cru peut être considéré comme première source de contamination, mais que la chair du poisson reste exempte de *L. monocytogenes*.

Dans les deux cas, la contamination reste faible avec un taux inférieur à 100 UFC / g. EKLUND *et al.* (1995) ont également mis en évidence, à partir de 48 échantillons de saumons fumés prélevés dans 6 établissements américains, un faible taux de contamination compris entre 0,3 et 34,3 *L. monocytogenes* / g. Le taux moyen rencontré pour chaque entreprise est compris entre 0,7 et 10,9 *Listeria monocytogenes* / g.

La recherche de *Listeria* réalisée sur plusieurs filets différents (2 ou 3), appartenant à un même lot, montre une répartition hétérogène de la bactérie (puisque deux échantillons sur trois sont contaminés) dans l'entreprise N° 1 et homogène dans l'entreprise N° 2.

Le seul facteur commun à ces deux sites est la présence de *L. monocytogenes*.

Ces deux exemples représentent des cas de figure totalement opposés et soulignent le fait que chaque atelier est un cas particulier.

Dans le premier cas, la contamination répertoriée au stade du conditionnement reste aléatoire puisque *Listeria* n'est pas retrouvée dans l'ensemble des produits finis. Ce type de

Tableau XII : Recherche de *Listeria* au cours du procédé de transformation, atelier 1.

Prélèvements	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
Matières premières	3	<100	-	-	-	
	4	<100	-	-	-	
	5	<100	-	-	-	
Après filetage	6	<100	-	-	-	
	7	<100	-	-	-	
	8	<100	-	-	-	
Après salage	9	<100	-	-	-	
	10	<100	-	-	-	
	11	<100	-	-	-	
Sortie maturation	12	<100	-	-	-	
	13	<100	-	-	-	
	14	<100	-	-	-	
Sortie fumage	15	<100	-	-	-	
	16	<100	-	-	-	
	17	<100	-	-	-	
Sortie raidissage	18	<100	-	-	-	
	19	<100	-	-	-	
	20	<100	-	-	-	
Avant tranchage	21	<100	-	-	-	
	22	<100	-	-	-	
	23	<100	-	-	-	
Après conditionnement	24	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	25	<100	-	-	-	
J 0	26	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>

s : Suspicion

Tableau XIII : Recherche de *Listeria* au cours du procédé de transformation, atelier 2.

Prélèvements	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
Matières premières	45	<100	-	-	-	
	46	<100	-	-	-	
	47	<100	-	-	-	
Après filetage	48	<100	-	-	-	
	49	<100	-	-	-	
	50	<100	-	-	-	
Après salage	51	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	52	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	53	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
Sortie maturation	54	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	55	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	56	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
Sortie fumage	57	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	58	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	59	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
Avant tranchage	60	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	61	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	62	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
Après conditionnement	63	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	64	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
J 0	65	<100	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>

s : Suspicion

contamination au moment du conditionnement, peut être considérée comme un point critique dans une démarche de type HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), à cause de l'intervention d'opérations manuelles.

La mise en évidence de points critiques, qui représente le deuxième principe d'une démarche HACCP implique l'établissement d'actions correctives (principe 5 de HACCP JOUVE 1993, MOY *et al.* 1994).

La localisation de la contamination à partir de la dernière étape du procédé facilite une intervention. Une désinfection de l'ensemble du matériel utilisé après le stade "avant tranchage" jusqu'en fin de procédé (matériel de tranchage, de mise en plateau, de pesée et de conditionnement sous vide) doit vraisemblablement éliminer ce risque de contamination. Cette opération doit bien entendu être complétée par une formation du personnel intervenant en fin de procédé, par une réduction éventuelle des manipulations et une définition précise des tâches de chaque intervenant.

Dans le deuxième cas, la contamination localisée au stade "après salage" est plus systématique puisque tous les échantillons analysés révèlent la présence de *L. monocytogenes*. Le caractère systématique de la contamination peut être expliqué par le mode salage, réalisé par un système d'injection, avec une saumure recyclée. L'analyse de saumures, dans des ateliers utilisant ce mode de salage, relève la présence de *L. monocytogenes* (EKLUND *et al.* 1995). Ces auteurs ont également montré que les recherches de *Listeria*, effectuées sur la peau ou sur la chair du saumon (de 0 à 1 cm de la surface), sont positives à 50% avec un salage par injection. Alors que pour un salage par immersion, seuls les échantillons de surface sont positifs.

Ce stade du salage est considéré comme un point critique de rang 2 par HUSS (1991) dans une analyse HACCP appliquée à la production du saumon fumé. Une intervention sur un point critique de rang 2 permet de minimiser le risque mais non d'en assurer la maîtrise totale, alors qu'une intervention sur un point critique de rang 1 assure la maîtrise totale du risque (HUSS 1992).

Une première action corrective à envisager pourrait être la mise en place d'une désinfection plus importante du système d'injection et d'un contrôle accru de la saumure utilisée, avec un renouvellement plus fréquent de celle-ci. Cette action devrait être couplée naturellement à une désinfection totale des équipements et de leur environnement situés en aval de l'étape de salage.

Ces suivis de lignes montrent que la répartition de *Listeria* est étroitement liée à un site industriel en particulier. Une étude de type "écologie d'atelier", couplée à des méthodes d'identification à haut pouvoir de discrimination (profil d'isoenzymes [RORVIK *et al.* 1995], RAPD), devrait permettre de déterminer les principales sources de contamination du produit et individualiserait une voie de contamination.

Mais seule une démarche de type HACCP, dont le but est de contrôler les facteurs en relation avec la contamination, la survie et la croissance des micro-organismes dans l'aliment, à tous les stades de sa fabrication, peut conduire à une véritable maîtrise de la qualité microbiologique du produit fini (HUSS 1992, JOUVE 1992).

I. 3. Tests de conservation des produits finis.

L'étude de la ligne de production a été complétée par des tests de conservation des produits finis à 4 et 8°C. 4°C représente la température de conservation conseillée par le producteur de saumon fumé et 8°C peut représenter la température rencontrée dans les présentoirs frigorifiques de la distribution ou le frigidaire ménager.

L'évolution de la qualité microbiologique, vis à vis de *Listeria* après 21 jours de stockage à 4°C, montre que la contamination reste très faible : < 50 UFC / g dans les deux entreprises (Tableaux XIV et XIV).

Temps de stockage	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
7 jours	27	<50	s	-	-	<i>L. monocytogenes</i>
	28	<50	-	-	-	
	29	<50	-	-	-	
14 jours	33	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	34	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	35	<50	-	-	-	
21 jours	39	<50	-	-	-	
	40	<50	-	-	-	
	41	<50	-	-	-	

Tableau XIV : Tests de conservation à 4°C, entreprise 1.

s : suspicion

Temps de stockage	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
7 jours	66	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	67	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
14 jours	72	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	73	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
21 jours	78	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	79	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>

Tableau XV : Tests de conservation à 4°C, entreprise 2.

s : suspicion

Le dénombrement des échantillons stockés à 8°C pendant 14 et 21 jours indique un taux de contamination > 50 UFC / g et même supérieur à 100 UFC / g : valeur limite recommandée par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (Tableaux XVI et XVII).

Temps de stockage	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
7 jours	30	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	31	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	32	<50	-	-	-	
14 jours	36	4,9.10 ³	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	37	<50	-	-	-	
	38	<50	-	-	-	
21 jours	42	<50	-	-	-	
	43	8,12.10 ²	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	44	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>

Tableau XVI : Tests de conservation à 8°C, entreprise 1.

s : suspicion

Temps de stockage	N° Ech	Méthode AFNOR V 08-055				Identifications
		J 0	J 24	B 24	B 48	
7 jours	69	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	70	<50	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
14 jours	75	10 ²	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	76	1,5.10 ²	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
21 jours	81	3.10 ²	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>
	82	1,4.10 ³	s	s	s	<i>L. monocytogenes</i>

Tableau XVII : Tests de conservation à 8°C, entreprise 2.

s : suspicion

Les concentrations maximales enregistrées en *Listeria* sont de l'ordre de 10^3 UFC / g pour les échantillons provenant des deux sites étudiés.

Pour le site N° 1, la contamination est aléatoire : après 21 jours de conservation à 8°C, 1 échantillon sur 3 ne répond pas au critère d'acceptabilité.

Dans le cas du site N° 2, les échantillons sont tous contaminés en *Listeria monocytogenes*, mais le critère d'acceptabilité n'est pas dépassé à 4°C. A 8°C au contraire les analyses réalisées après 14 jours de stockage révèlent une contamination supérieure au critère.

L'ensemble de ces tests de conservation confirme la capacité de *L. monocytogenes* à se développer dans le saumon fumé à 4°C, même pour des contaminations initiales très faibles (GUYER et JEMMI 1991, RORVIK *et al.* 1991, FARBER 1991).

La différence entre les deux sites étudiés réside dans la répartition de *Listeria* dans le produit fini, qui semble plus aléatoire dans l'entreprise N° 1 que dans l'entreprise N°2. Dans les deux cas *L. monocytogenes* est décelée, montrant l'implantation de cette bactérie au niveau de l'atelier de production. Cependant, si la température de stockage de 4°C est bien respectée les produits finis sont acceptables jusqu'à 21 jours. Un stockage à 8°C est fortement déconseillé, la plupart des produits ne respectant plus le critère d'acceptabilité de 10^2 UFC /g.

Des tests complémentaires sur des produits finis ont été effectués afin d'évaluer la durée limite de consommation (DLC) des saumons fumés, qui pendant longtemps était fixée arbitrairement et pouvait varier de 21 à 35 jours selon le producteur.

Aujourd'hui, elle est définie par le Norme AFNOR V 45-065 dans les termes suivants : "définie sous la responsabilité du fabricant, la date limite de consommation (DLC) figurant sur les produits présentés réfrigérés doit être inférieure ou égale à 21 jours, à partir de la sortie du circuit de fabrication."

Pour apprécier d'une part l'impact du temps de stockage mais aussi l'importance du couple temps / température, qui n'est jamais fixe dans la réalité, nous avons suivi l'évolution de la population *Listeria* pour un lot de saumons fumés. Différentes combinaisons temps / température ont été établies.

Les premières combinaisons 28 jours à 4°C et 28 jours à 8°C nous ont servi de témoin. Les suivantes : 21 jours à 4°C suivis de 7 Jours à 8°C et 15 jours à 4°C suivis de 6 jours à 8°C sont représentatives d'une rupture de la chaîne du froid, par passage au cours du stockage d'un même échantillon de 4 à 8°C .

Les résultats observés sont rapportés dans le Tableau XVIII.

Date	28 Jours à 4°C		28 Jours à 8°C		15 Jours à 4° puis 6 Jours 8°C		21 Jours à 4°C puis 7 Jours à 8°C	
d'analyse	UFC / g	Recherche dans	UFC / g	Recherche dans	UFC / g	Recherche dans	UFC / g	Recherche dans
(en jours)		25 g		25 g		25 g		25 g
J. 1	<100	s	<100	s	<100	s	<100	s
	<100	s	<100	s	<100	s	<100	s
					<100	s	<100	
J. 8	<100	s	<100	-	<100	s	<100	s
	<100	s	$1,2 \cdot 10^4$	s	<100	s	<100	s
					<100	s	<100	s
J. 14	<100	s	$1,35 \cdot 10^5$	s	<100	s	<100	s
	<100	s	illisible à dilution	s	<100	s	<100	s
			-1		<100	s	<100	s
J. 22	<100	s	$2,48 \cdot 10^6$	s	<100	s	<100	s
	<100	s	négatif à - 2	s	<100	s	<100	-
					100	s	<100	-
J. 29	<100	s	$4 \cdot 10^4$	s			$7,3 \cdot 10^3$	s
	<100	s	$3,73 \cdot 10^4$	s			<100	s
							<100	s
J. 35	<100	s						
	500	s						

Tableau XVIII: Evolution de la population *Listeria* dans un lot de saumon fumé en fonction du couple temps /température de stockage.

S : suspicion.

Les échantillons utilisés dans cette étude sont positifs en sortie usine pour une recherche de *Listeria* dans 25/g, mais le taux de contamination est faible et inférieur à 100 UFC / g.

Au cours d'un stockage de 28 jours à 4°C, les échantillons positifs pour la recherche dans 25 g présentent toujours un taux de contamination inférieur à 100 UFC / g. Seul, un échantillon sur deux dépasse ce seuil, après 35 jours de stockage à 4°C.

Par contre un stockage à 8°C confirme les tendances précédemment observées avec éventuellement un taux de contamination supérieur à 100 *Listeria* / g dès 8 jours de stockage.

Pour les deux combinaisons utilisées lors de la simulation de la rupture de la chaîne du froid, un échantillon sur trois ne répond plus à la recommandation de 100 *Listeria* / g.

Ces résultats montrent l'effet du temps de stockage, qui pour des produits faiblement contaminés ($<10^2$ *Listeria* /g) ne doit pas dépasser 28 jours, pour une température rigoureuse de 4°C (qui n'est pas toujours le cas dans les circuits de distribution).

Ces informations soulignent l'importance et la nécessité du respect de la température de conservation des produits à 4°C.

Pour apprécier la qualité microbiologique de leurs produits, les producteurs de saumons fumés doivent disposer de méthodes de détection fiables et rapides.

II. DETECTION DES *LISTERIA*.

De nombreuses techniques de détection des *Listeria* ont vu le jour depuis la dernière décennie. Celles-ci sont basées sur l'enrichissement sélectif en *Listeria* suivi d'un système de détection reposant sur des caractéristiques biochimiques. L'incompatibilité des délais d'analyses, des premières méthodes traditionnelles de recherche de *Listeria*, avec les exigences des industries alimentaires a contribué au développement de protocoles plus adaptés et plus rapides. Les progrès apportés ont dans un premier temps amélioré la sélectivité des enrichissements et des géloses d'isolement de *Listeria*, et dans un deuxième temps introduit de nouveaux systèmes de détection comme la réaction immuno-enzymatique ou l'hybridation de sondes nucléiques.

II. 1. EVALUATION DES TECHNIQUES DE DETECTION DES *LISTERIA*.

La technique IPL pour la détection des *Listeria*, utilisée au début de cette étude (1992), présente l'inconvénient majeur d'être très longue. En effet la durée d'une analyse, avec le temps d'enrichissement et la caractérisation de la souche, est de l'ordre de 11 Jours. Ce délai de réponse pose problème et depuis quelques années des méthodes dites rapides sont apparues sur le marché. Les kits immuno-enzymatiques faisant partie de cette nouvelle génération de méthodes de détection semblent prometteurs, mais demandent à être comparés aux méthodes traditionnelles.

II. 1. 1. Etude comparative entre la méthode IPL pour la détection des *Listeria* et le kit immuno-enzymatique commercialisé par TRANSIA.

Quatre catégories d'aliments ont été choisies comme support de cette recherche :

- les produits carnés : 40 échantillons (abats, portion unitaire, charcuterie),
- les produits laitiers: 49 échantillons (fromages à pâte cuite, fleurie, lavée, laits, yaourts, beurres),
- les produits végétaux : 60 échantillons (frais, IV gamme),
- les produits de la mers : 42 échantillons (poissons frais, préparés fumés).

Les résultats globaux de l'étude comparative entre la méthode IPL et le kit TRANSIA sont rapportés dans le Tableau XIX. Parallèlement au kit TRANSIA chaque subculture des échantillons a été isolée sur PALCAM pour confirmation.

Considérant la méthode IPL comme la méthode de référence, nous avons défini les données : a, b, c, d, selon les indications de NORRUNG *et al.* (1991).

		IPL	
		+	-
TRANSIA	+	a	b
	-	c	d

a = vrais positifs : échantillons positifs en TRANSIA et positifs avec la méthode IPL.

b = "faux positifs" : échantillons positifs en TRANSIA, mais négatifs avec la méthode IPL.

Les échantillons positifs en TRANSIA ayant été confirmés sur PALCAM, mettent en évidence la déficience de la méthode référence (IPL) à révéler ces échantillons positifs.

Dans le cadre de l'AFNOR, organisme intervenant pour la validation de méthodes rapides, ces "faux positifs" définis par NORRUNG sont appelés plus judicieusement "positifs supplémentaires". Nous avons adopté cette appellation dans la suite de notre propos, en raison de la justesse de l'idée qu'elle représente.

c = faux négatifs : échantillons négatifs en TRANSIA, mais positifs avec la méthode IPL.

d = vrais négatifs : échantillons négatifs en TRANSIA et négatifs avec la méthode IPL.

A partir de ces valeurs a, b, c, d, il est possible de définir différents paramètres.

La sensibilité : capacité à détecter les échantillons positifs

$$\text{Sensibilité} = \frac{a}{a + c}$$

La spécificité : capacité à détecter les échantillons négatifs.

$$\text{Spécificité} = \frac{d}{b + d}$$

L'efficacité : la probabilité à donner un bon résultat.

$$\text{Efficacité} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Echantillons	191	IPL		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
		+	-			
TRANSIA	+	42	9	76 %	93 %	88 %
	-	13	127			

Tableau XIX : Comparaison entre la méthode IPL et kit TRANSIA.

Calculée pour l'ensemble des produits, toutes catégories confondues, l'efficacité du kit TRANSIA est de 88 % par rapport à notre méthode de référence (ici méthode IPL). Cette efficacité est le résultat de la combinaison d'une spécificité acceptable avec 93 % et d'une sensibilité un peu faible de 76 %. Cette faible sensibilité se justifie par un nombre élevé de faux négatifs : 13 sur 191 échantillons analysés.

Globalement, la méthode de détection des *Listeria* utilisée à l'IPL paraît plus efficace que le kit TRANSIA puisque le nombre de positifs supplémentaires est inférieur au nombre de faux négatifs. Mais l'existence de ces positifs supplémentaires et faux négatifs indique qu'aucune des deux méthodes n'est fiable à 100 %.

L'étude de diverses catégories d'aliments a permis de mettre en évidence des différences dans la sensibilité, la spécificité et l'efficacité du kit TRANSIA selon le type d'aliment analysé. Parmi toutes ces catégories, les produits de la mer ont présenté les plus faibles pourcentages :

- . 62 % pour la sensibilité,
- . 84 % pour la spécificité,
- . 76 % pour l'efficacité.

La séparation des produits de la mer en trois sous catégories selon le degré de transformation (poissons frais, préparés ou fumés) nous renseigne sur l'origine de ces faibles pourcentages (Tableau XX).

Echantillons	nombre éch	TRANSIA	IPL		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
			+	-			
Poissons frais	8	+	0	2	0 %	71 %	62 %
		-	1	5			
Poissons préparés	15	+	5	0	83 %	100 %	93 %
		-	1	9			
Poissons fumés	19	+	5	2	55 %	80 %	68 %
		-	4	8			
Total	42	+	10	4	62 %	84 %	76 %
		-	6	22			

Tableau XX : Comparaison de la méthode IPL et le kit TRANSIA pour la catégorie des produits de la mer .

Les poissons préparés permettent d'obtenir des résultats corrects avec le kit TRANSIA. Le nombre de positifs supplémentaires et faux négatifs, faible et presque identique reflète l'équivalence des deux méthodes.

Les poissons frais par contre avec une sensibilité de 0 % montrent qu'il n'existe aucune concordance des résultats positifs entre les deux méthodes. Il faut rappeler que le nombre d'échantillons analysés est faible.

La sous catégorie des poissons fumés, qui nous intéresse plus particulièrement, présente une faible sensibilité 55 % et une faible efficacité 68 %. Le nombre de positifs supplémentaires étant inférieur au nombre de faux négatifs affirme la supériorité de la méthode IPL par rapport au kit TRANSIA.

Les milieux d'enrichissement primaire utilisés dans ces deux méthodes sont différents : LEB pour la méthode IPL, UVM pour le kit TRANSIA. L'efficacité du kit TRANSIA pourrait être améliorée par mélange des deux milieux après enrichissement et la réalisation de l'essai immuno-enzymatique sur ce mélange. Cependant le coût analytique serait fortement augmenté.

II. 1. 2. Etude comparative entre différents kits immuno-enzymatiques : TRANSIA, TECRA, VIDAS.

Les premiers résultats obtenus avec le kit TRANSIA sur les poissons fumés n'étant pas complètement satisfaisants, nous avons testé deux autres kits immuno-enzymatiques : le kit *Listeria* commercialisé par TECRA et le kit VIDAS commercialisé par Biomérieux.

II. 1. 2. 1. Détermination des seuils de détection des trois kits.

Les suspensions obtenues par dilution d'une culture pure de *Listeria monocytogenes* ($1,14.10^9$ UFC / ml) titrant $1,14.10^6$ UFC / ml à $1,14.10^3$ UFC / ml, nous ont permis de déterminer le seuil de détection des trois kits. Les résultats sont rapportés dans le Tableau XXI.

Titre de la suspension en <i>Listeria monocytogenes</i>	Réponse TRANSIA	Réponse TECRA	Réponse VIDAS
$1,14.10^3$	-	-	-
$1,14.10^4$	-	-	-
$1,14.10^5$	+	+	+
$1,14.10^6$	+	+	+

Tableau XXI : Evaluation du seuil de détection pour les kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.

Les trois kits présentent une réponse homogène et le seuil de détection des *Listeria* par ces réactions immuno-enzymatiques se situe entre 10^4 et 10^5 *Listeria* / ml.

Les seuils de détection obtenus sont rapportés au titre de la suspension initiale et non à la quantité de bactéries réellement introduite dans les puits, la quantité de la prise d'essai étant variable selon le kit utilisé. La forte valeur du seuil de détection des différents kits implique la nécessité de l'étape d'enrichissement de l'aliment en *Listeria*. Une détection directe ne peut être envisagée.

II. 1. 2. 2. Comparaison des résultats obtenus avec les trois kits immuno-enzymatiques.

L'UVM1 étant préconisé comme enrichissement primaire pour les kits TRANSIA et TECRA et le LEB étant utilisé par le kit VIDAS, ces deux enrichissements ont été employés en parallèle. Des échantillons de saumons fumés d'origine différente, prélevés dans le commerce, font l'objet de cette étude.

Les résultats obtenus avec un enrichissement primaire en LEB sont identiques pour les trois kits immuno-enzymatiques testés. Dans ce cas, la sensibilité est inférieure à celle obtenue avec un enrichissement primaire en UVM quelque soit le kit testé. Une incubation en LEB génère plus de faux négatifs qu'une incubation en UVM (Tableaux XXII et XXIII).

L'enrichissement primaire LEB préconisé par le kit VIDAS, à la date de réalisation de cette étude, a été remplacé par la suite par le Fraser, milieu très proche de l'UVM.

Aucun positif supplémentaire n'est décelé avec un enrichissement LEB : la spécificité est maximale. La spécificité de 77 % avec une incubation en UVM résulte de l'existence de positifs supplémentaires. Ceux-ci ont été décelés par les trois kits pour les mêmes échantillons.

L'efficacité légèrement plus faible a été mise en évidence avec un enrichissement en UVM pour TECRA et VIDAS. Celle de TRANSIA est équivalente pour les deux enrichissements (LEB, UVM).

La comparaison des trois kits dans le cas d'un enrichissement UVM montre que TRANSIA permet d'obtenir des résultats légèrement supérieurs, mais cette technique reste néanmoins inférieure à la méthode IPL pour la détection des *Listeria* dans le saumon fumé.

Avec 48 heures d'incubation en LEB, la technique IPL permettrait de détecter 80 % des échantillons positifs obtenus par la même méthode après un enrichissement de 168 heures.

Temps de détection	J 0	J 48	B 48	J 168	B 168
nb d'échantillons positifs	3	9	1	2	1
% d'éch positifs à 48 h ou 168 h	13 (81 %)			3 (19 %)	

Tableau XXIV : Nombre d'échantillons positifs détectés en fonction de la durée de l'enrichissement avec la méthode IPL.

LEB	IPL		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	+	10	66 %	100 %	79 %
	-	5			
TECRA	+	10	66 %	100 %	79 %
	-	5			
VIDAS	+	10	66 %	100 %	79 %
	-	5			

Tableau XXII : Utilisation d'un enrichissement primaire en LEB pour l'évaluation des kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.

UVM	IPL		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	+	12	80 %	77 %	79 %
	-	3			
TECRA	+	11	73 %	77 %	75 %
	-	4			
VIDAS	+	11	73 %	77 %	75 %
	-	4			

Tableau XXIII : Utilisation d'un enrichissement primaire en UVM pour l'évaluation des kits TRANSIA, TECRA, VIDAS.

La diminution de la durée de l'enrichissement dans le protocole IPL aboutit à un recouvrement des échantillons positifs moins important qu'en 168 heures, mais du même ordre que celui des trois kits.

II. 1. 3. Application de la norme AFNOR V 08-055.

Les techniques traditionnelles de recherche de *Listeria* ont considérablement évolué ces dernières années, notamment dans l'optique de la standardisation et la réduction des temps d'incubation des enrichissements.

Les directives générales de Février 1993 du projet de norme ISO ont mis l'accent sur ces deux critères. La méthode préconisée, employée pour toutes les catégories d'aliments, limite l'incubation des enrichissements à 72 heures. Suite à ces directives l'AFNOR a mis en place courant 1993 la norme V 08-055 (Matériel et Méthodes).

La première démarche, de notre recherche dans l'application de cette nouvelle technique, a été son utilisation en parallèle avec la méthode IPL.

II. 1. 3. 1. Utilisation en parallèle des méthodes IPL et norme AFNOR V 08 -055.

Le support de ces analyses est constitué de 20 échantillons de saumons fumés conditionnés sous vide. Les résultats obtenus sont rapportés dans le Tableau XXV.

20 Ech	IPL		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
+	13	1	92,8 %	83,3 %	90 %
V 08-055					
-	1	5			

Tableau XXV : Comparaison de la méthode IPL et V 08-055 dans l'analyse de saumons fumés.

Les forts pourcentages obtenus pour la sensibilité, la spécificité et l'efficacité de la méthode V 08-055 par rapport à notre méthode référence IPL, confirme la validité de ce protocole. Il faut cependant insister sur la différence des temps d'incubation des enrichissements, qui marque la supériorité de la technique V 08-055 sur la méthode IPL. L'existence d'un positif supplémentaire et d'un faux négatif révèle qu'aucune des deux méthodes n'est fiables à 100%.

Ce protocole d'enrichissement particulièrement attractif nous a amené à l'utiliser dans l'EIA TRANSIA, sélectionné parmi les trois kits utilisés.

II. 1. 3. 2. Comparaison du kit TRANSIA et AFNOR V 08-055.

Cette étude a été réalisée sur 20 échantillons de saumons fumés conditionnés sous vide et sur 24 échantillons de saumons fumés ayant subi un stockage de 4 mois au congélateur.

Pour les poissons congelés, une revivification de 4 heures dans la base Fraser a été pratiquée avant d'ajouter les antibiotiques.

Dans cette comparaison, la technique V 08-055 a été choisie comme méthode référence et le kit TRANSIA a été réalisé sur la subculture de 24 heures d'enrichissement en Fraser, dont les résultats sont rapportés dans le Tableau XXVI.

20 Ech (sous vide)	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	13	0	92,8%	100 %	95 %
	1	6			
24 Ech (Congelés)	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	12	1	100 %	91,66%	95,83 %
	0	11			

Tableau XXVI : Saumons fumés congelés ou conditionnés sous vide : comparaison de la technique V 08-055 et le kit TRANSIA

Dans le cas des échantillons conditionnés sous vide ou congelés, les pourcentages enregistrés pour la sensibilité, la spécificité et l'efficacité du kit TRANSIA, par rapport à la méthode référence (ici la méthode V 08-055) sont supérieurs à 90%.

Le pourcentage de ces données pour le même kit TRANSIA utilisant les enrichissements recommandés (UVM 1, Fraser) avec la méthode IPL comme référence n'excédait pas 80% (cf Tableau XXIII).

La concordance des résultats entre le kit TRANSIA utilisant les enrichissements de la nouvelle technique et la méthode V 08-055, comparable à la méthode IPL, est satisfaisante.

II. 1. 3. 3. Influence du temps de revivification sur la détection des *Listeria* par la méthode V 08-055 et le kit TRANSIA.

L'utilisation d'une étape de revivification dans le cas des saumons fumés congelés, nous a incité à introduire cette étape dans l'analyse des produits conditionnés sous vide.

En effet, le saumon frais au cours du procédé de transformation passe par divers stades (salage, fumage, congélation) au cours desquels *Listeria* peut subir des lésions. Cette revivification est effectuée dans la base Fraser sans antibiotique. AMOAKO *et al.* (1992) ont montré que le recouvrement des *L. monocytogenes* stressées, 5 minutes à 60°C ou congelées à -20°C pendant 7 jours, était supérieur dans un milieu non sélectif (TSBYE) par rapport à un milieu sélectif (LEB + antibiotiques).

Pour étudier l'effet de la revivification sur la détection de *Listeria* dans les saumons fumés conditionnés sous vide, nous avons choisi arbitrairement 5 temps de revivification : 0, 1, 2, 4, 6 heures. Parallèlement à l'étude de ce facteur nous avons comparé la méthode V 08-055 et le kit TRANSIA, réalisé sur la subculture de 24 heures d'enrichissement.

La sensibilité, la spécificité et l'efficacité du kit sont améliorées par l'existence d'une étape de revivification. En effet un pourcentage de 100 est obtenu pour les différentes données quel que soit le temps de revivification appliqué (Tableau XXVII).

L'obtention d'une totale concordance des résultats par l'introduction de cette étape de revivification souligne son importance. En effet, nous constatons par l'observation de la répartition des échantillons positifs rapportée dans le Tableau XXVIII, que leurs nombres augmentent avec le temps de revivification.

Temps de revivification	Temps d'incubation total des enrichissements.				
	dénombrement direct	24 Heures	48 Heures		72 Heures
			V 08-055	TRANSIA	
0 heure	1/10	6/10	7/10	6/10	7/10
1 heure	2/10	7/10	7/10	7/10	7/10
2 heures	3/10	8/10	8/10	8/10	8/10
4 heures	3/10	7/10	7/10	7/10	7/10
6 heures	3/10	7/10	9/10	9/10	9/10

Tableau XXVIII : Nombre d'échantillons positifs en fonction du temps d'incubation des enrichissements et du temps de revivification obtenu par la méthode V 08-055 et le Kit TRANSIA.

10 Ech (0 heure) ^a	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	6	0	85,7 %	100 %	90 %
	1	3			

10 Ech (1 heure) ^a	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	7	0	100 %	100 %	100 %
	0	3			

10 Ech (2 heures) ^a	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	8	0	100 %	100 %	100 %
	0	2			

10 Ech (4 heures) ^a	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	7	0	100 %	100 %	100 %
	0	3			

10 Ech (6 heures) ^a	V 08-055		Sensibilité	Spécificité	Efficacité
	+	-			
TRANSIA	9	0	100 %	100 %	100 %
	0	1			

Tableau XXVII : Influence du temps de revivification ^a sur les résultats obtenus par les méthodes V 08-055 et TRANSIA pour l'analyse de saumons fumés.

L'ensemble des échantillons positifs sont obtenus après 48 heures d'incubation totale : soit après 24 heures d'incubation de la subculture en Fraser, couplé à une revivification de 6 heures.

BUSCH et DONNELLY (1992), ont montré que le recouvrement de cellules stressées thermiquement n'était pas effectif en 5 heures d'incubation avec les enrichissements généralement utilisés dans les méthode de recherche comme les milieux : FDA broth, LEB, UVM. Par contre, l'utilisation du milieu LRB (*Listeria Repair Broth*), mis au point par cette équipe, permet un recouvrement presque total des cellules stressées en 5 heures d'incubation à 37°C. Les grandes différences entre le milieu LRB et les autres milieux testés, sont la composition et l'absence d'agents sélectifs, qui sont ajoutés après ce préenrichissement de 5 heures. Cette démarche constitue en fait une étape de revivification et confirme l'importance de celle-ci.

FLANDERS et DONNELLY (1994) ont démontré la supériorité d'un recouvrement, de cellules stressées cette fois par congélation, après une préincubation sans antibiotique. Cependant, les résultats de l'analyse d'échantillons d'environnement de produits laitiers ou carnés ne présentent pas de différence significative par l'introduction d'une étape de revivification, fixée dans ce cas à 3 heures.

MARTIN et KATZ (1993) ont mis au point une technique d'analyse appelée RSK (*Resuscitation/ Selection /kit system*) utilisant également une étape de revivification, fixée à 4 Heures. L'analyse d'échantillons de fromage présente, par cette procédure, un nombre d'échantillons positifs légèrement supérieur à celui de la méthode préconisée par le *Bacteriological Analytical Manual*. L'ensemble de ces observations rejoint celle d'AMOAKO *et al.* (1992) et confirme la nécessité d'une incubation même très courte dans un milieu sans antibiotique pour améliorer le recouvrement des cellules stressées et par conséquent la détection des *Listeria* dans un aliment.

II. 1. 4. Utilisation de sondes nucléiques dans la recherche de *Listeria monocytogenes*.

Si le début de la décennie 1980-1990 a marqué le développement des méthodes conventionnelles de détection de *Listeria* dans les produits alimentaires, la nouvelle décennie représente une étape supplémentaire avec une détection spécifique des *L. monocytogenes*, basée sur l'hybridation moléculaire.

II. 1. 4. 1. Kit GENE TRAK.

Pour la mise au point du premier kit GENE TRAK, détectant *Listeria spp*, des études comparatives entre la méthode FDA et ce kit, ont mis en évidence la supériorité du GENE TRAK pour des produits laitiers contaminés artificiellement. En effet, avec 107 positifs (GENE TRAK) contre 47 (FDA), les faux négatifs représentent 4,5% pour le GENE TRAK contre 58 % pour la méthode FDA. De même la comparaison sur les produits de la mer entre les méthodes USDA,

FDA et le GENE TRAK a révélé respectivement un pourcentage de faux négatifs de 8,6 ; 11 et 5,3 % (RYSER et MARTH 1991).

D'autre part, URL *et al.* (1993) ont montré que le GENE TRAK présente 5,8 % de faux négatifs par rapport à la méthode IDF. Ces auteurs expliquent la détection de faux négatifs par la différence des temps d'enrichissement : de 7 jours pour l'IDF contre 24 heures pour le GENE TRAK. Il semble que pour certains échantillons, le seuil de détection de l'ordre de $5 \cdot 10^5$ *Listeria* / ml n'ait pas été atteint en 24 heures d'enrichissement.

L'intérêt de cette méthode de détection ayant été confirmé, un nouveau kit spécifique de *L. monocytogenes*, a été développé et commercialisé sur le marché français depuis début 1993.

Pour tester la spécificité de cette méthode vis à vis de *L. monocytogenes*, nous avons choisi des échantillons contenant soit des *L. monocytogenes*, soit des *L. innocua*. Cette sélection s'est pratiquée sur des saumons fumés préalablement analysés par la technique V 08-055 et le kit TRANSIA (Tableau XXIX).

Echantillons	GENE TRAK Absorbance (interprétation)	Identification galerie API <i>Listeria</i>
contrôle négatif GENE TRAK	0,10 (négatif)	
contrôle positif GENE TRAK	2,46 (positif)	
2	2,24 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
3	2,24 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
5	2,31 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
9	2,23 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
12	2,27 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
13	0,05 (négatif)	<i>Listeria innocua</i>
17	1,90 (positif)	<i>Listeria monocytogenes</i>
18	0,03 (négatif)	<i>Listeria innocua</i>
19	-0,08 (négatif)	négatif
20	0,06 (négatif)	négatif

Tableau XXIX : Kit GENE TRAK appliqué à la catégorie des saumons fumés.

Sur les dix échantillons testés, la concordance des résultats obtenus par le kit et la méthode d'identification conventionnelle est totale. L'étude de la spécificité de la sonde réalisé par le fabricant sur 320 souches de *Listeria* et 83 souches que *Listeria* n'a pas mis en évidence de réaction croisée (Protocole GENE-TRAK).

Nous avons également appliqué la recherche de *L. monocytogenes* par sondes nucléiques à des échantillons de matière première et de produits finis congelés, complétant ainsi la gamme des différents états du saumon rencontrés en site industriel.

La méthode AFNOR et le kit TRANSIA ont été utilisés en parallèle (Tableau XXX).

N° ECH	AFOR V 08-055				GENE TRAK	TRANSIA	Identification
	JO	J24	B24	B48			
26	-	-	-	-		-	
27	-	-	-	-		-	
28	-	-	-	-		-	
29	-	-	-	-		-	
30	-	-	-	-		-	
31	-	-	-	-		-	
32	-	-	-	-		-	
33	-	-	-	-		-	
34	-	-	-	-		-	
35	-	-	-	-		-	
36	-	-	-	-	-	-	
37	-	-	-	-	-	-	
38	-	+	+	+	-	+	<i>L. innocua</i>
39	-	+	+	+	-	+	<i>L. innocua</i>
40	-	-	-	-	-	-	
41	-	-	-	-	-	-	
42	-	-	-	-	-	-	
43	-	+	+	+	-	+	<i>L. innocua</i>
44	-	-	-	-	-	-	
*45	-	-	-	-	-	-	
*46	-	-	-	-	-	-	
*47	-	-	-	-	-	-	
*48	-	-	-	-	-	-	
*49	-	-	-	-	-	-	

Tableau XXX : Recherche de *Listeria* sur des saumons frais ou congelés selon la norme AFNOR, la méthode GENE TRAK (*L. monocytogenes*) ou le kit immuno-enzymatique TRANSIA.

* Analyse réalisée après revivification sur des saumons congelés

La comparaison de ces trois méthodes met en évidence la concordance des résultats AFNOR et TRANSIA, dans la recherche de *Listeria spp*, et confirme la non interférence de la présence de *Listeria innocua* dans la réponse du kit GENE TRAK *L. monocytogenes*.

La première approche de la détection de *L. monocytogenes* par hybridation de sondes nucléiques est encourageante au niveau des résultats obtenus après 48 heures d'incubation et des trois heures nécessaires à la manipulation du kit GENE TRAK, pour les échantillons de saumons frais, congelés, ou fumés et conditionnés sous vide.

II. 1. 4. 2. Kit GEN PROBE.

Le Gen Probe utilise une sonde, marquée par un ester d'acridine, capable de reconnaître une région cible située au niveau du r RNA de *L. monocytogenes*.

Initialement utilisé sur des bouillons de culture, le seuil de détection de cette technique est estimé à 10^5 bactéries / ml.

NINET *et al.* (1992 a) ont testé ce kit avec plusieurs milieux (Brain Heart infusion broth : BHI, Tryptic Soy Broth : TSB, FDA broth, PALCAMY, UVM) contenant une culture pure de *Listeria monocytogenes*. Seuls l'UVM et le PALCAMY donne un signal négatif. Mais par un lavage des cellules il est possible d'obtenir un signal positif soulignant le caractère inhibiteur de ces milieux sur la réaction d'hybridation. Le FDA, ne présente pas ce désavantage, et autorise la détection des *L. monocytogenes* après enrichissement, même en présence d'une flore de compétition importante. Dans le cas d'un faible nombre de *L. monocytogenes*, le kit n'est pas suffisamment sensible pour être appliqué directement et nécessite un enrichissement pour atteindre 10^6 *Listeria* / ml bouillon FDA.

NIEDERHAUSER *et al.* (1993) ont montré la faible sensibilité (33%) de ce kit utilisé sur un enrichissement secondaire de 24 heures dans du FDA enrichment broth, d'échantillons de fromages à pâte molle contaminés artificiellement. Pour cette raison, le protocole actuel du kit GEN Probe préconise l'utilisation de colonies, obtenues par écouvillonnage du milieu d'enrichissement sur géloses. En plus de l'augmentation de la sensibilité de la méthode, ce passage par gélose d'isolement permet également d'éviter les faux négatifs dûs aux effets inhibiteurs des fortes concentrations en sel sur l'étape d'hybridation (PARTIS *et al.* 1994).

Pour la recherche de *L. monocytogenes* à l'aide du Kit GEN PROBE, nous avons choisi d'utiliser les colonies caractéristiques obtenues sur gélose PALCAM.

Contrairement au kit GENE TRAK, il n'a donc pas été nécessaire de réaliser une recherche sur toute la gamme de saumon (frais, fumé et congelé) puisque l'application du kit GEN PROBE est conditionnée par l'obtention de colonies suspectes.

Toujours par souci de comparaison, nous avons couplé cette recherche à la méthode AFNOR et une technique immuno-enzymatique : le kit VIDAS (Tableau XXXI).

La comparaison des résultats de la méthode AFNOR et le kit VIDAS met en évidence la concordance entre ces deux méthodes vis à vis de la présence de *Listeria spp*. Le kit GEN PROBE montre sa supériorité dans la détection des *L. monocytogenes* à partir de géloses d'isolement. En effet, pour les deux autres méthodes : AFNOR et VIDAS, la réponse est une présence ou absence de suspicion en *Listeria spp* et le résultat final est conditionné par l'identification de la souche à l'aide de caractères biochimiques. Mais cette identification réalisée sur un nombre limité de colonies (5 selon la norme AFNOR V 08 - 055), reste aléatoire .

Le Kit GEN PROBE, testant toutes les colonies de la gélose d'isolement, fait disparaître complètement ce côté aléatoire et donne une réponse plus fiable. L'identification dans le cas de l'échantillon N° 50 ou N° 51, à partir d'un isolement de l'enrichissement secondaire du VIDAS illustre bien cette remarque. Les cinq colonies identifiées, sur le nombre total de colonies, confirment le résultat du test EIA par la présence de *Listeria spp*, mais ne mettent pas en évidence *L. monocytogenes*. Cette constatation ne remet pas en cause le type d'enrichissement utilisé mais plutôt la technique d'identification, basée sur des caractères biochimiques, qui ne permet de tester qu'un nombre restreint de colonies suspectes.

La grande sensibilité du kit GEN PROBE, pouvant être réalisé sur une seule colonie, lui confère un important avantage qu'est celui de l'identification, en plus de la propriété de détection, si le kit est appliqué à l'ensemble des colonies d'une gélose d'isolement.

Ces premiers résultats obtenus avec le GEN PROBE, semblent plus prometteurs que ceux obtenus par NIEDERHAUSER *et al.*(1993). Le test GEN PROBE est très intéressant par sa rapidité d'exécution et par les possibilités qu'il offre en terme d'identification.

La méthode IPL pour la détection des *Listeria* présente un délai de réponse de l'ordre de 11 jour. Cet inconvénient peut être palié par l'utilisation de méthodes rapides comme les kits immuno-enzymatiques qui permettent de détecter *Listeria* en 48 Heures. La méthode AFNOR V 08-055, dont nous avons montré l'équivalence avec la méthode IPL est bien corrélée avec le kit TRANSIA, pour les échantillons de saumons congelés ou conditionnés sous vide. Celle-ci est maximale avec l'introduction d'une étape de revivification avant l'enrichissement en milieu sélectif.

La vérification de la spécificité, vis à vis de *L. monocytogenes* et l'absence d'interférence avec *L. innocua*, des sondes nucléiques GENE TRAK et GEN PROBE en font des outils particulièrement intéressants pour la recherche de *Listeria* dans les saumons fumés.

Echantillons (stockage)	Recherche AFNOR		Recherche par le KIT VIDAS		
	Identification API	identification GEN PROBE <i>L. monocytogenes</i> (RLU) *	Réponse du kit	Identification API	Identification GEN PROBE <i>L.monocytogenes</i> (RLU) *
N° 50 : (J 21, 4°C)	<i>L. monocytogenes</i>	(67240) +	+	<i>L. seeligeri</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i>	(142492) +
N° 51 : (J 21, 4°C)	<i>L. monocytogenes</i>	(138340) +	+	<i>L. seeligeri</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i>	(105769) +
N° 52 : (J 21, 4°C)	<i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i>	(166963) +	+	<i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>L. monocytogenes</i>	(194596) +
N° 50 : (J 21, 8°C)	<i>L. monocytogenes</i>	(230438) +	+	<i>L. monocytogenes</i>	(163123) +
N° 51 : (J 21, 8°C)	<i>L. monocytogenes</i>	((170752) +	+	<i>L. seeligeri</i> <i>L. seeligeri</i> <i>L. innocua</i> <i>L. innocua</i> <i>L. monocytogenes</i>	(189237) +
N° 52 : (J 21, 8°C)	<i>L. monocytogenes</i>	(195243) +	+	<i>L. monocytogenes</i>	(227336) +
<i>L. innocua</i> 6a			+	<i>L. innocua</i>	(4322) -

Tableau XXXI: Recherche de *Listeria* sur des saumons fumés selon la norme AFNOR et le kit immunoenzymatique VIDAS. Les identifications ont été réalisées avec le kit GEN PROBE spécifique de *L. monocytogenes* (sondes nucléiques) et par galerie API.

* Les échantillons produisant un signal > 50 000 RLU (Relativ Luminescens Unit) sont considérés comme positifs

* Les signaux < 50 000 RLU sont considérés comme négatifs.

Les évolutions enregistrées depuis une dizaine d'années dans la recherche de *Listeria* mettent à notre disposition des outils très variés dans leur efficacité et leur coût d'analyse. Le choix d'une technique est conditionné par la nature de l'échantillon : matière première, produit en cours de fabrication produit finis ou d'environnement mais aussi par les critères et délais d'obtention des résultats. Le Tableau XXXII récapitule quelques caractéristiques des différentes techniques utilisées dans notre étude, afin de faciliter le choix de la méthode à appliquer selon les objectifs fixés

Les méthodes présentées ici ne sont pas les seules existantes sur le marché. Depuis 1990, un pas décisif a été franchi avec la détection spécifique de *L. monocytogenes*. De nouveaux supports pour les réactions de type immuno-enzymatique comme le cône (VIDAS), les billes immuno magnétiques (Listerscreen AES) ou le système clearview (OXOID) ont également été développés.

II. 2. ADAPTATION DE LA METHODE DE RECHERCHE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* (ET DE *LISTERIA SPP*) DANS LE SAUMON FUME .

Précédemment (Chapitre II. 1. 3. 3), nous avons démontré une amélioration des résultats obtenus, par l'introduction d'un préenrichissement en milieu non sélectif,. Cette étape que nous avons appelée revivification, peut également être d'un intérêt capital pour l'évaluation de la contamination initiale d'un produit.

En effet, la technique classique de dénombrement par étalement de 0,1 ml du bouillon d'enrichissement, avant incubation, permet d'estimer la contamination en *Listeria*. Cependant, celui-ci étant réalisé sur un milieu sélectif ne peut être que par défaut, ne permettant pas le développement des bactéries lésées.

II. 2. 1. Introduction d'une étape de revivification.

II. 2. 1. 1. Intérêt d'une étape de revivification appliquée à l'analyse de saumons fumés.

Certaines conditions environnementales ou chimiques défavorables peuvent provoquer chez les bactéries non sporulées des variations métaboliques, structurales et des lésions physiologiques. L'ensemble de ces conditions est généralement regroupé sous le terme de stress.

Critères	TRANSIA	TECRA	VIDAS	GENE TRAK <i>Listeria spp</i>	GENE TRAK <i>Listeria monocytogenes</i>
Détection	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria spp</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Principe	EIA anticorps monoclonaux	EIA anticorps polyclonaux	EIA anticorps monoclonaux	Sonde rRNA cible	Sonde rRNA cible
Analyses par kit	96	96	60	100	100
Temps d'incubation des enrichissements	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures
Temps d'incubation kit	1 heure 30	1 heure 30	45 minutes (6 analyses)	2 heures 30	2 heures 30
Lecture	DO 450nm	visuelle ou DO 490nm	DO 450 nm	DO 450 nm	DO 450 nm
Accessoires (ordre de Prix HT)	Lecteur de microplaque (30 à 50 000 F)	éventuellement lecteur microplaque (30 à 50 000 F)	automate Mini VIDAS (160 000 F)	Kit accesssoire 4800 F HT	Kit accesssoire 4800 F HT
Prix Hors Taxes d'un kit	4400 F	3850 F	1500 F	5000F	5700F
Prix Hors Taxes d'une analyse sans l'enrichissement	45 F	40 F	25 F	50 F	57 F

Tableau XXXII : Caractéristiques des différents kits utilisés dans la détection de *Listeria* dans les aliments.

Tout traitement destructeur, physique ou chimique, peut engendrer un stress s'il est appliqué à un niveau subléthal.

Différents types de traitements peuvent ainsi être répertoriés : les chocs thermiques, la réfrigération, la dessiccation, l'irradiation, la congélation, changement de l'environnement nutritionnel, les substances chimiques comme les désinfectants, les conservateurs, les acides...(BRISSENET *et al.* 1994).

En fonction de leur intensité, les traitements sublétaux peuvent avoir différents effets sur la cellule. Un stress de faible intensité peut conduire à un effet favorable pour la cellule par induction d'une réponse à ce stress, comme la synthèse de protéines ou de métabolites (tréhalose) lui conférant une résistance. Un traitement plus prononcé peut provoquer des lésions cellulaires ayant pour cibles l'ADN, l'ARN, les protéines, la paroi et la membrane cytoplasmique et affaiblissant la bactérie. L'effet devient léthal par augmentation du traitement (BRISSENET *et al.* 1994).

Par exemple, les traitements thermiques, qui sont à l'origine de la découverte des phénomènes de stress, ont montré qu'au delà de la température maximale de croissance et en dessous de la température de destruction, le stress induit la synthèse de protéines de choc thermique permettant la protection de la cellule et lui conférant une thermotolérance vis à vis d'un traitement ultérieur.

Par contre, l'application d'une température au delà de la température de destruction provoque des lésions cellulaires détruisant certaines bactéries alors que d'autres seront uniquement lésées et capables de réparer ces lésions (LINTON *et al.* 1992).

Au cours d'un procédé industriel il est possible d'éliminer les bactéries d'un produit en leur faisant subir une série de stress à des doses subléthales ne provoquant pas de résistance induite. En effet, la bactérie peut vaincre facilement un premier stress mais plus difficilement un deuxième voire un troisième stress.

Dans le cas d'un schéma technologique ne permettant pas de détruire les bactéries d'un produit, celles-ci peuvent se retrouver alors dans un état de lésion.

Ces bactéries lésées posent des problèmes au niveau analytique. En effet, les lésions chez les micro-organismes se traduisent souvent par leur inaptitude au recouvrement et à l'impossibilité de former des colonies sur milieux sélectifs, qui permettent par contre le développement des cellules en bon état physiologique. Les dénombrements directs sur milieux sélectifs donneront donc des résultats par défaut.

Sur un milieu sélectif contenant un taux élevé en sel ou des antibiotiques, les cellules lésées sont incapables de supporter ce deuxième stress et ne parviennent pas à réparer les dommages du premier. Par contre sur un milieu non sélectif les cellules lésées, étant capables de réparer les dommages du stress appliqué, vont se redévelopper et seront donc détectées (BUSCH et DONNELLY 1992, MEYER et DONNELLY 1992).

De plus ces cellules lésées, toujours vivantes, pourront éventuellement récupérer lentement dans le produit et s'y développer, constituant ainsi un risque potentiel vis à vis de la qualité microbiologique du produit.

Pour limiter le risque d'un dénombrement par défaut, par absence de recouvrement des cellules stressées, une étape de revivification peut être introduite en début d'analyse. Elle consiste à placer l'échantillon prélevé dans un milieu neutre (ex : base Fraser servant à l'enrichissement) sans les éléments sélectifs ou antibiotiques. Après une période d'incubation à température ambiante favorisant le recouvrement des bactéries lésées (LOVETT *et al.* 1991, MACKEY *et al.* 1994), le dénombrement est effectué puis l'enrichissement en *Listeria* est obtenu par addition des agents sélectifs.

Le bien fondé de cette étape de revivification à l'aide d'une culture pure de *Listeria* ayant subie un stress thermique a été étudié.

Les conditions d'application d'une étape de revivification dans l'analyse de saumon fumé ont été envisagées.

II. 2. 1. 2. Détermination des conditions de revivification sur souches pures

Pour mieux comprendre l'effet de l'étape de revivification et son impact sur le nombre de bactéries initialement présentes dans le produit analysé, nous avons simulé un stress thermique sur une culture pure de *Listeria* en bon état physiologique et nous avons suivi l'évolution de cette population en fonction du temps de revivification. Pour cette étude les trois souches suivantes ont été utilisées : *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, *L. monocytogenes* 1/2 b CLIP 12499 et *L. innocua* 6b ATCC 33091.

L'effet du stress thermique sur une culture de *Listeria*, évalué par dénombrement sur un milieu neutre (TSA) et un milieu sélectif (PALCAM), est représenté Fig 15.

A partir des valeurs de dénombrement sur TSA, il est possible de calculer le pourcentage de mortalité au cours des 10 premières minutes de stress.

$$\frac{\text{Nb B /ml sur TSA à t 0} - \text{Nb B /ml sur TSA à t 10}}{\text{Nb B / ml sur TSA à t 0}} \times 100$$

Celui-ci est respectivement de l'ordre de 75, 88 et 87 % pour *L. innocua*, *L.monocytogenes* 1/2 b et *L. monocytogenes* 4b.

Fig 15 : Evolution de la population Listeria au cours d'un stress thermique à 55°C.

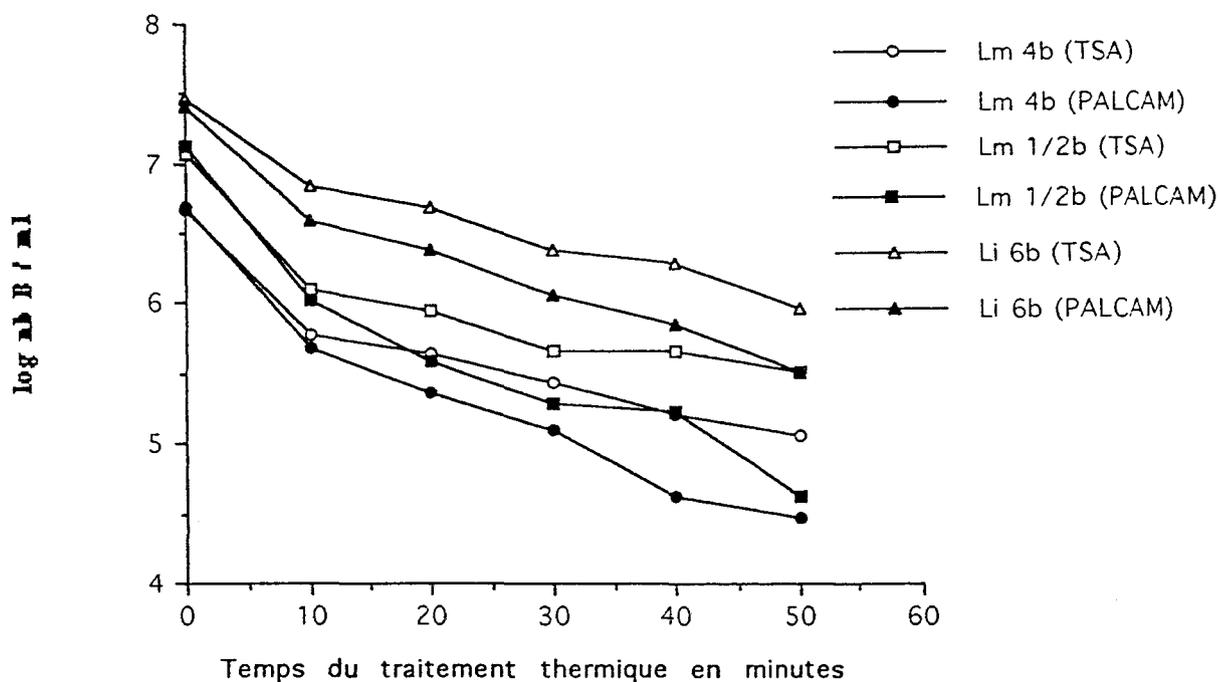
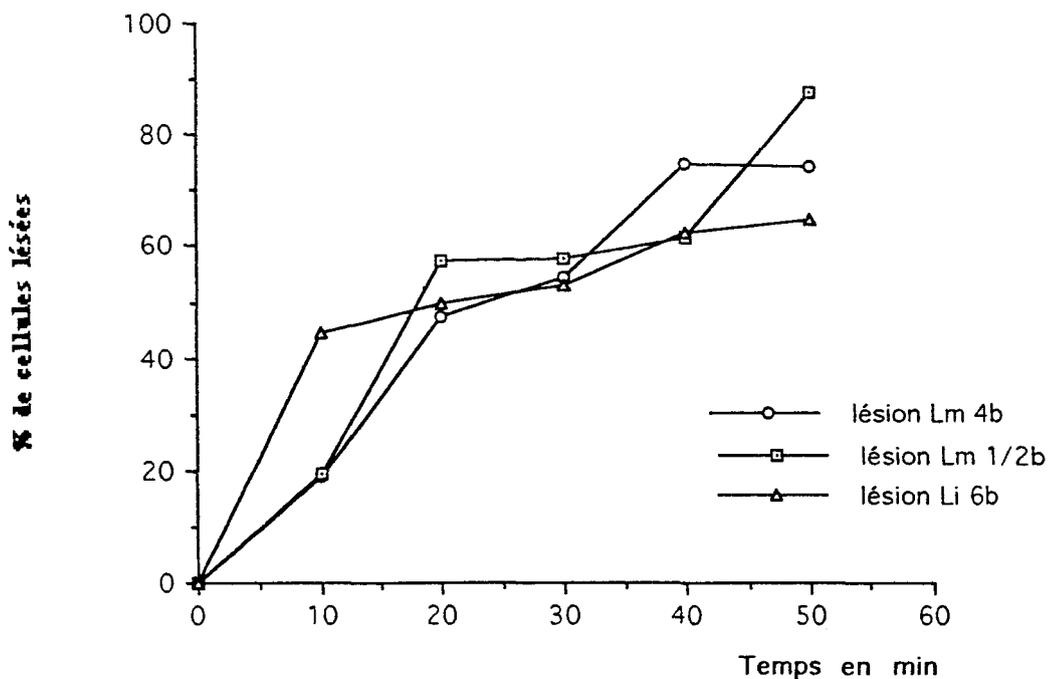


Fig 16 : Evolution du pourcentage de Listeria lésées en fonction de la durée du traitement thermique à 55°C.



Le pourcentage de cellules stressées, après une certaine durée du traitement thermique, peut être déterminé par la formule suivante :

$$\frac{\text{Nb B /ml sur TSA} - \text{Nb B /ml sur PALCAM}}{\text{Nb B / ml sur TSA}} \times 100$$

Avec une population initiale de l'ordre de 10^7 UFC / ml, nous dénombrons sur TSA entre 1.10^5 et 9.10^5 UFC / ml et sur PALCAM entre 3.10^4 et 3.10^5 UFC / ml, après 50 minutes à 55°C .

Nous observons après 50 minutes à 55°C , 87, 75 et 65 % de cellules lésées respectivement pour *L. monocytogenes* 1/2 b, *L. monocytogenes* 4 b et *L. innocua* 6b.

L'évolution du pourcentage de cellules lésées rapportée Fig 16 montre qu' une partie de la population de l'ordre de 45% de *L. innocua* est lésée dans les 10 premières minutes du traitement thermique. Ce pourcentage diminue par la suite, où il n' est plus que de l'ordre de 5 à 10 % toutes 10 minutes.

Dans le cas de *L. monocytogenes* (1/2 b et 4b), une partie de la population de l'ordre de 20% est lésée dans les 10 premières minutes du traitement thermique. Contrairement à *L. innocua*, ce pourcentage est encore de 30 % après 10 minutes supplémentaires (soit 20 minutes de stress), pour diminuer au delà de 20 minutes.

Listeria innocua présente dans les 10 premières minutes une mortalité plus faible que les deux souches de *Listeria monocytogenes* par contre, elle semble plus sensible aux phénomènes de lésions.

Ces populations de *Listeria*, après stress thermique (55°C , 50 minutes), sont soumises à une étape de revivification, par remise en suspension dans une base Fraser à 20°C . La visualisation de l'effet de la revivification, par dénombrement sur PALCAM révélant uniquement les cellules en bon état physiologique, est rapportée Fig 17.

Cet effet est amorcé après 1 heure d'incubation à température ambiante (20°C) pour les souches *L. innocua* et *L. monocytogenes* 1/2 b . En effet, l'augmentation du nombre de colonies enregistrée sur PALCAM au cours de ces 6 heures d'incubation indique un retour de certaines bactéries à un état physiologique satisfaisant puisqu'elles peuvent être dénombrées sur un milieu sélectif. Pour la souche *Listeria monocytogenes* 4b, le recouvrement des cellules lésées semble beaucoup plus long et apparaît après 5 heures .

Les valeurs observées nous permettent de déterminer le pourcentage de recouvrement des cellules au cours du temps de revivification. Ainsi, après 6 heures à 20°C , le pourcentage de recouvrement par rapport à la population initiale est pour :

Listeria innocua de 86%, soit un recouvrement effectif de 48%

Fig 17 : Evolution de la population de *Listeria* en fonction du temps de revivification à 20°C en base Fraser.

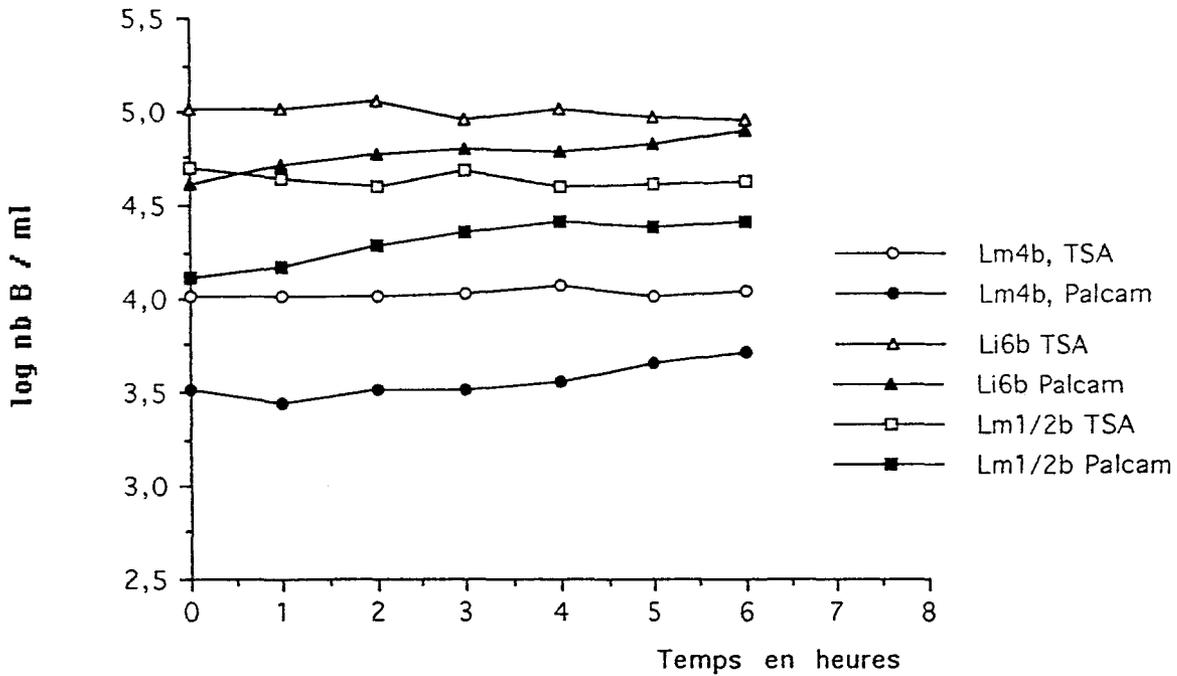
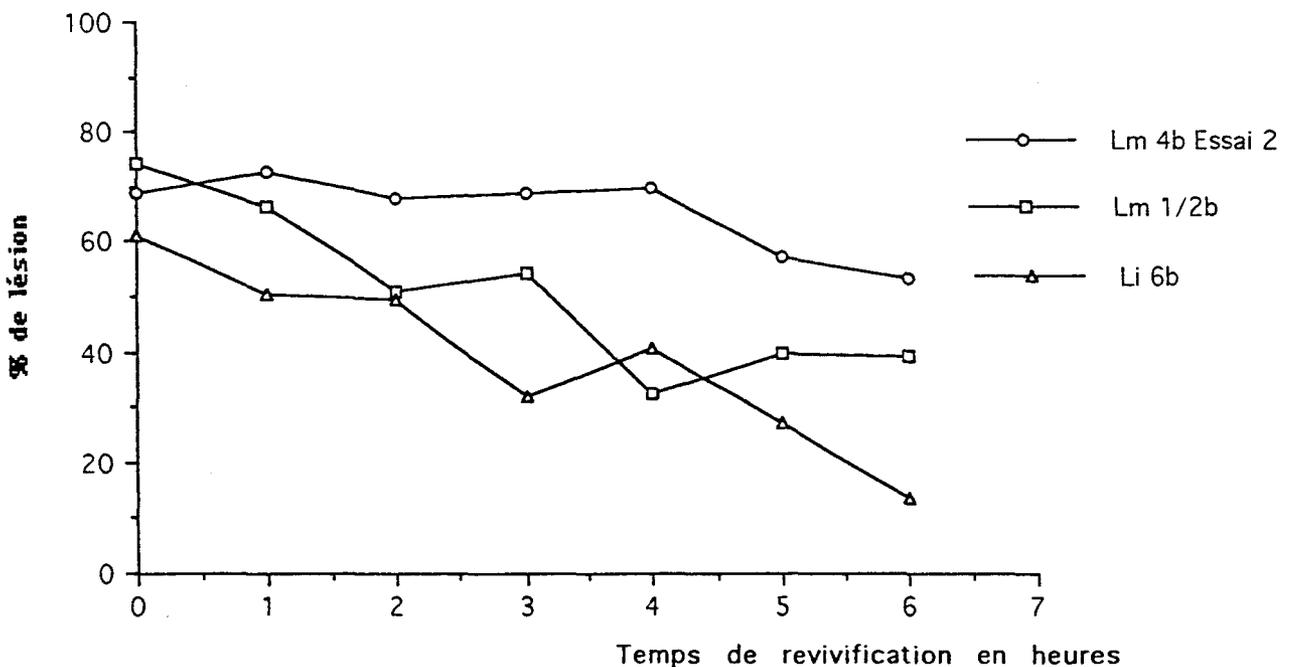


Fig 18 : Evolution du pourcentage de *Listeria* lésées au cours du temps de revivification dans une base Fraser à 20 +/- 1°C



Listeria monocytogenes 1/2b de 59,5%, soit un recouvrement effectif de 35%

Listeria monocytogenes 4b de 46,5% , soit un recouvrement effectif de 15,5% (Fig 18).

Afin de ne pas fausser le résultat d'un dénombrement direct de l'échantillon analysé, nous devons nous assurer que le temps de revivification choisi ne permettra pas le développement de *Listeria* non stressées

Un témoin a été réalisé en soumettant des populations *Listeria*, n'ayant pas subi de traitement thermique, à une revivification de 6 heures en base Fraser à 20°C.

Le suivi de l'évolution de ces populations *Listeria* présente une variation de +0,1 log N bactéries / ml par rapport à la population initiale après 4 heures et de + 0,5 log N bactéries / ml après 5 heures d'incubation en base Fraser (Fig 19).

Le temps de revivification à appliquer pour ne pas initier un début de croissance ne doit donc pas excéder 5 heures, au risque d'obtenir une faible croissance, même si pour cette durée le pourcentage de revivification n'est pas maximal.

La revivification peut éventuellement être améliorée par l'addition de composés favorisant la réparation des dommages cellulaires comme l'ion Fe²⁺, le pyruvate de sodium, l'extrait de levure, (BUSCH et DONNELLY 1992). Cependant, le milieu résultant ne correspond plus au milieu d'enrichissement initial risquant d'introduire une étape supplémentaire dans le protocole de recherche des *Listeria*. Une incubation en anaérobiose peut être envisagée pour améliorer le recouvrement des cellules stressées thermiquement afin de limiter l'effet toxique de l'oxygène (MENDONCA et KNABEL 1994).

Les conditions de la revivification déterminées sur souches pures et en milieu de laboratoire doivent être évaluées sur le saumon fumé, pour éliminer les risques de croissance dus à la matrice alimentaire.

II. 2. 1. 3. Vérification sur saumons fumés des conditions de revivification établies pour des souches pures.

La difficulté de vérifier la condition de revivification de *Listeria* sur saumons fumés réside dans l'existence de la flore de contamination, qui s'exprime sur gélose neutre TSA et ne permet pas de dénombrer les *Listeria*. A partir des saumons fumés préparés par IFREMER, pour réaliser nos challenge-test dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle, nous avons pu tenter quelques expériences de revivification avant dénombrement, la contamination initiale de ces produits étant très faible (Fig 20).

Une variation de l'ordre de $\pm 0,5$ log N bactéries a été mise en évidence pour des dénombrements de *Listeria* réalisés, après 5 heures de revivification, sur des échantillons de saumons fumés. Bien que cette variation soit peu significative après 5 heures de revivification, nous avons choisi un

**Fig 19 : Evolution de la population Listeria
en base Fraser à 20 +/- 1 °C.**

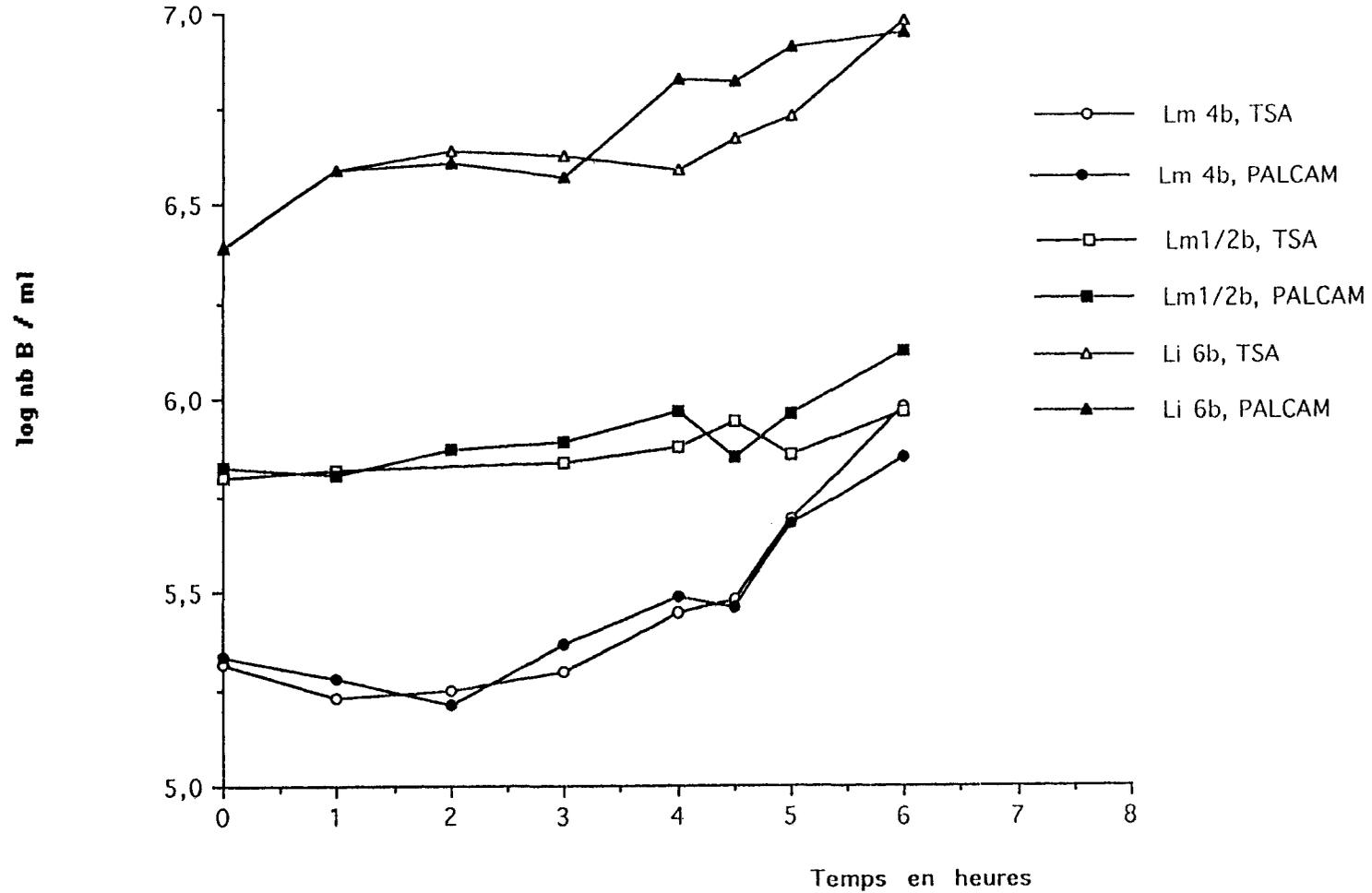


Fig 20a : Evolution de la population *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 en fonction du temps de stockage à 12°C d'un saumon à 0,97 mg de phénols / 100 g et à 3,76% NaCl

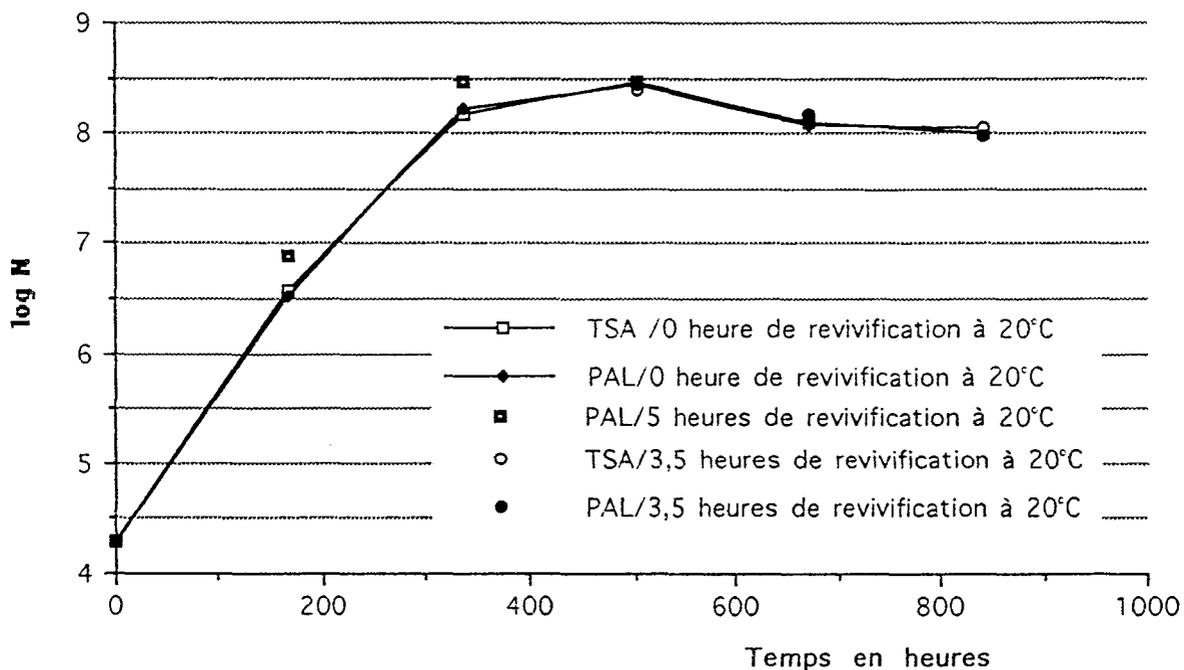
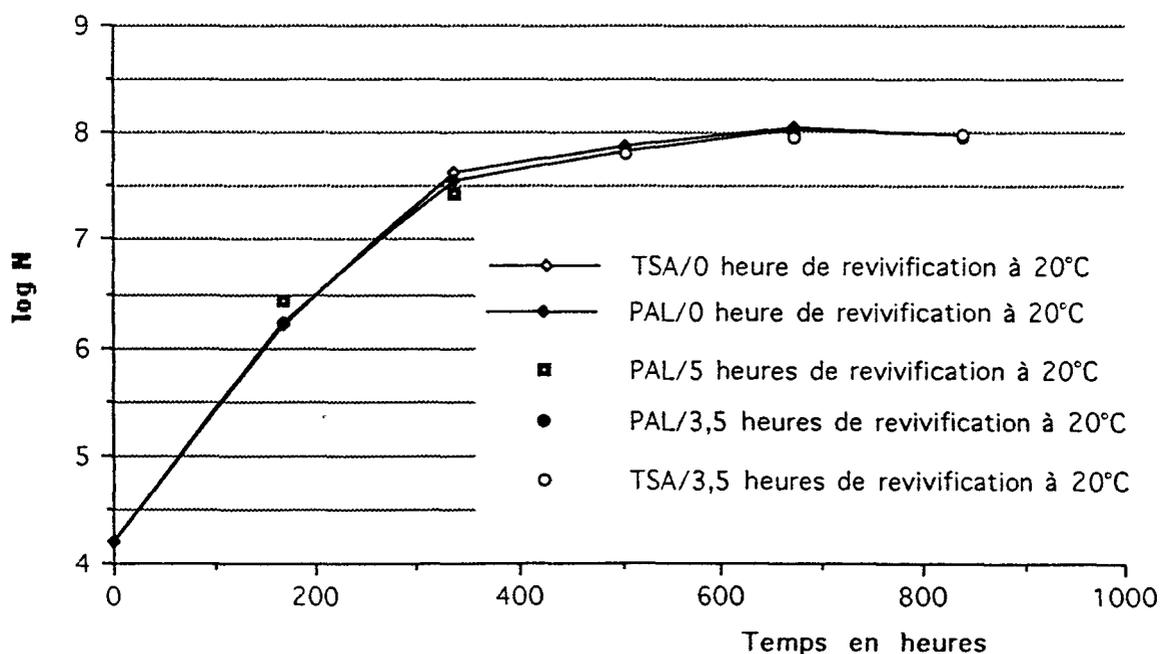


Fig 20b : Evolution de la population *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 en fonction du temps de stockage à 12°C d'un saumon à 1,1 mg de phénols / 100 g et à 3,86% NaCl



temps de revivification de 3 heures 30 qui n'entraîne pas de modification par rapport à un dénombrement sans revivification dans le cas des échantillons de saumons fumés.

Il est intéressant de noter l'absence de différence entre les résultats obtenus sur gélose TSA et PALCAM. Ceci nous permet de penser qu'une contamination après fabrication, représentée ici par l'inoculation artificielle, n'engendre pas de stress de la population *Listeria*. Les stress pouvant être éventuellement rencontrés par *Listeria* se situent au cours du procédé de transformation avec l'étape de salage, de séchage et de fumage.

Dans le cas d'un dénombrement direct, pour estimer le taux de contamination en *Listeria*, cette détermination préliminaire du temps de revivification demande à être confirmée sur un nombre plus conséquent d'échantillons de saumons. Dans le cas d'une simple recherche, le temps de revivification peut être augmenté sans aucune conséquence puisqu'il s'agit d'une démarche qualitative et non quantitative.

II. 2. 2. Optimisation des techniques de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le saumon fumé.

L'ensemble de nos études mené jusqu'à présent sur les méthodes de détection des *Listeria* dans les aliments nous a conduit à la mise en place d'une technique de recherche de *L. monocytogenes* appliquée au saumon fumé.

Celle-ci doit répondre à la demande de l'industriel à savoir : rapidité, fiabilité, facilité d'utilisation et prendre en compte le fait que l'analyse se déroule sur un produit en sortie usine ou un produit à DLC.

II. 2. 2. 1. Produit en fin de fabrication (cf Fig 21).

Principe : La recherche de *Listeria monocytogenes* nécessite les différentes étapes décrites ci-dessous:

*** Prise d'essai :**

Une prise d'essai de 25 g peut être réalisée selon l'annexe 2 de la norme saumon fumé. 225 ml de bouillon d'enrichissement (base Fraser) sont additionnés. L'ensemble est homogénéisé 1 minute au stomacher puis laisser 3H30 à température ambiante (20°C) pour revivification.

*** Dénombrement direct :**

Prélever 2 fois 0,1 ml de l'homogénéisat et l'étaler à la surface d'une gélose PALCAM puis incubé à 37°C (J0).

Après 24 et 48 heures, examiner les géloses pour contrôler la présence de colonies suspectes.

Afin d'améliorer la précision du dénombrement, le nombre de prélèvement de 0,1 ml de l'homogénéisat réalisé peut être augmenté et être couplé à une dilution plus faible de l'échantillon (ex : dilution au 1/5).

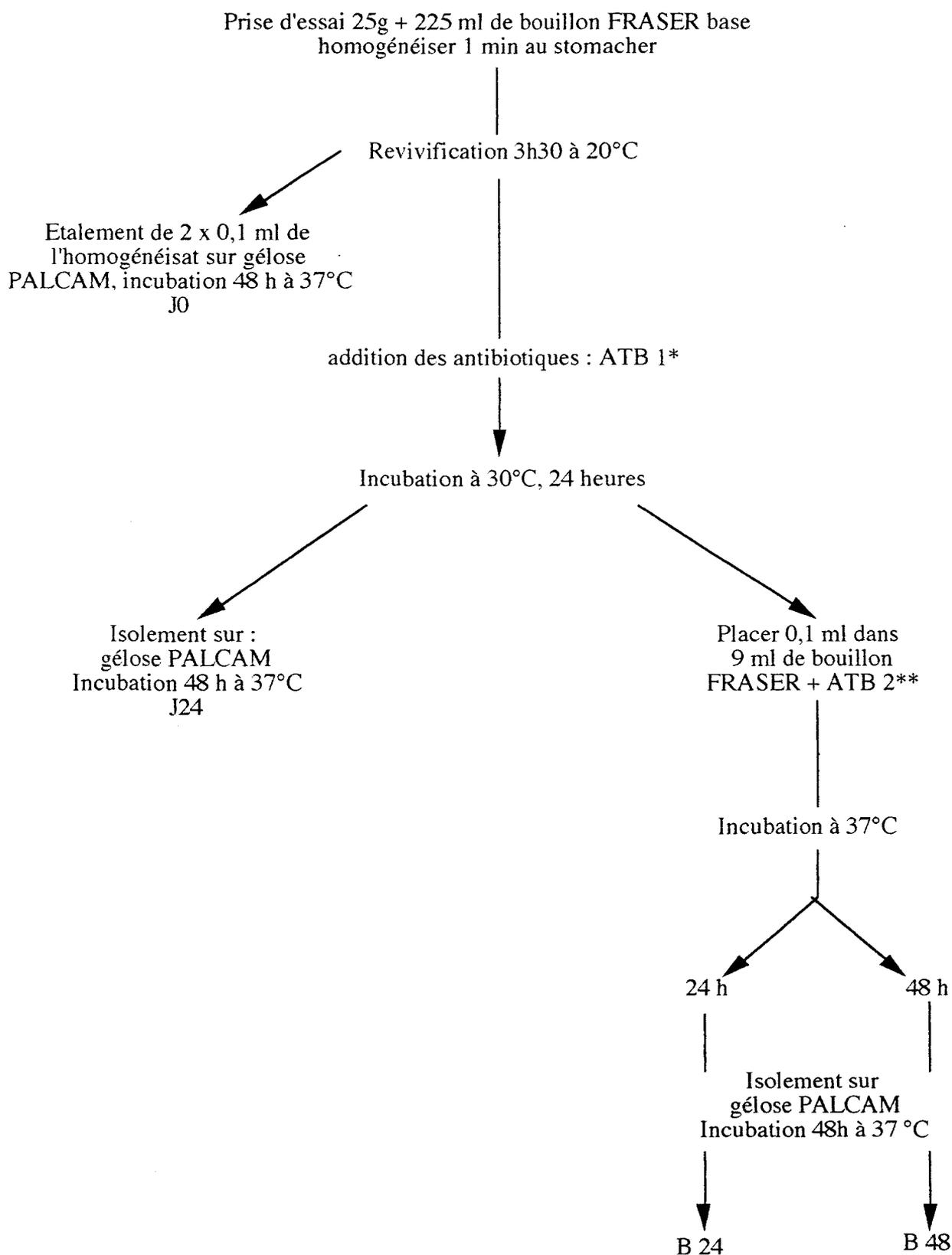


Fig 21 : Recherche de *L. monocytogenes* sur un saumon fumé en fin de fabrication.

J : enrichissement primaire B : enrichissement secondaire chiffre : temps d'incubation en heures

*ATB 1 : 10 mg / l d'acide nalidixique

12,5 mg / l d'acriflavine

0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal

3 g / l de LiCl

**ATB 2 : 20 mg / l d'acide nalidixique

25 mg / l d'acriflavine

0,5 g / l de citrate de fer ammoniacal

3 g / l de LiCl

* Enrichissement primaire en milieu Fraser au demi :

Après l'étape de revivification de 3H30, les antibiotiques ATB 1 (Acriflavine 12,5 mg/l et acide nalidixique 10 mg/l) sont ajoutés à la suspension. Le bouillon est incubé à 30°C pendant 24 heures.

* Isolement de l'enrichissement primaire :

A partir de l'enrichissement primaire, ensemercer en stries serrées une gélose PALCAM. Celle-ci est incubée à 37°C. Après 24 et 48 heures, examiner les géloses pour contrôler la présence de colonies suspectes (J 24).

* Enrichissement secondaire en Fraser complet :

L'enrichissement secondaire consiste à réaliser une subculture par inoculation de 0,1 ml de l'enrichissement primaire dans 10 ml de bouillon Fraser complet (Acriflavine 25 mg/l et acide nalidixique 20 mg/l). Cette subculture est incubée à 37°C pendant 24 heures, suivie d'une nouvelle incubation de 24 heures.

* Isolement de l'enrichissement secondaire :

A partir de la subculture réalisée en Fraser complet et à la fin de chacune des deux périodes d'incubation (24 et 48 heures), ensemercer en stries serrées des géloses PALCAM, qui sont incubées à 37°C 48 heures et seront désignées B 24 et B 48 (24 et 48 correspondant à la durée de l'incubation de la subculture).

II. 2. 2. 2. Produit à DLC (cf Fig 22).

Dans ce cas la technique de recherche est limitée au dénombrement direct par l'étalement de 2 fois 0,1 ml sur gélose PALCAM, après l'homogénéisation de la prise d'essai dans le Fraser au 1/2. En effet, le produit doit respecter la recommandation de 10^2 *Listeria monocytogenes* / g, et l'indication d'une présence / absence dans 25 g n'a plus d'intérêt, le produit étant arrivé en fin de conservation. L'introduction d'une étape de revivification ne semble pas nécessaire à ce stade de l'analyse puisque un stress éventuel semble plutôt lié au procédé de transformation et non au phénomène de stockage.

II. 2. 2. 3. Identification de *Listeria*.

Comme il est décrit dans le chapitre Matériel et Méthodes, l'identification de *Listeria* se fait de façon traditionnelle sur cinq colonies typiques, par une identification présomptive en examinant les colonies sur gélose PALCAM. Puis une identification du genre et de l'espèce est réalisée par une coloration de GRAM et galerie API *Listeria*. Enfin un test de confirmation de l'espèce *monocytogenes* (CAMP test) peut être effectué .

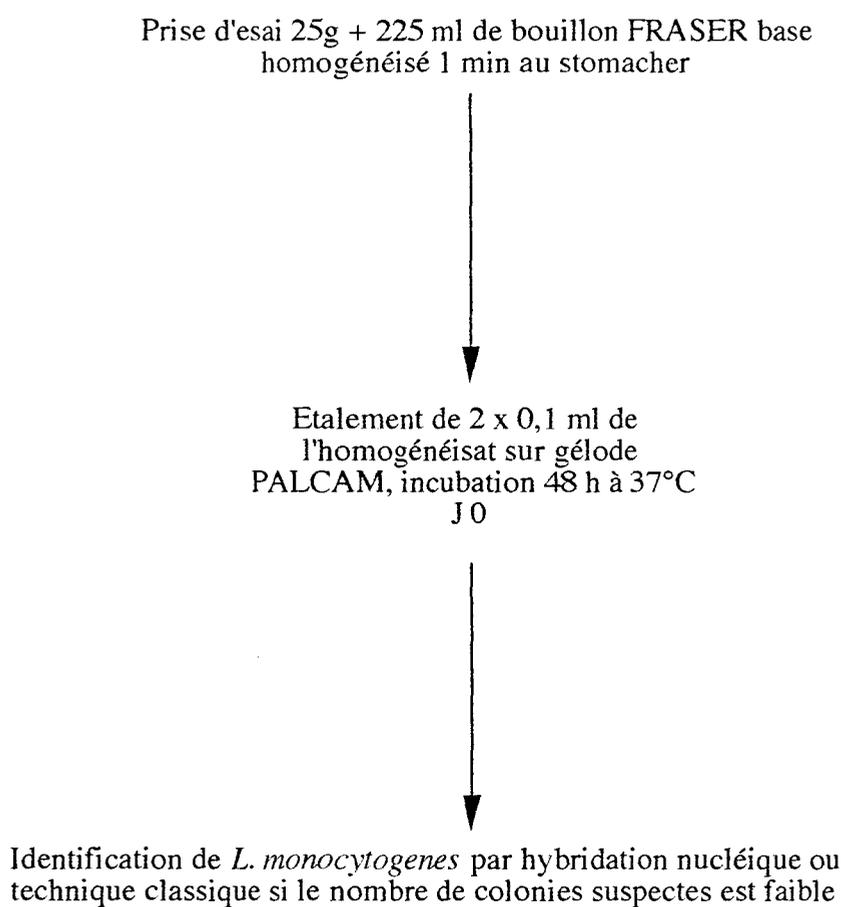


Fig 22 : Recherche de *L. monocytogenes* dans un saumon fumé à DLC

Une détection spécifique de *L. monocytogenes* par sondes nucléiques peut également être pratiquée, à partir des géloses PALCAM incubées 48 heures. Actuellement, il existe deux Kits de détection de *Listeria monocytogenes* sur le marché français : le kit GEN PROBE et le kit GENE TRAK. La procédure utilisée pour l'application de ces kits est différente de la méthode classique. En effet, dans le cas présent la détection est réalisée sur l'ensemble des colonies existant sur la gélose et le passage par une culture pure n'est pas nécessaire puisqu'il s'agit d'hybridations spécifiques de sondes nucléiques.

Les techniques d'identification décrites ci-dessus peuvent être utilisées lors d'une analyse en sortie usine ou à DLC. Cependant, l'analyse à DLC peut révéler au niveau du dénombrement direct (J0) un nombre plus important de colonies suspectes, dû à une multiplication éventuelle de *Listeria* au cours du stockage. Dans ce cas, la technique de l'hybridation de sondes nucléiques semble plus appropriée, étant plus précise au niveau des résultats puisque toutes les colonies sont testées.

II. 2. 2. 4. Expression des résultats.

* Identification par méthode classique.

Nb de colonies suspectes: N	Nb de colonies identifiées comme <i>L. monocytogenes</i> : x	Expression des résultats	Qualité du résultat
$0 \leq N < 2$	$0 \leq x < 2$	$< x.1/v.d$ $< 1.10^2 L. monocytogenes /g$	S
$2 < N < 6$	Toutes les colonies sont soumises à identification : * $0 \leq x < 2$	$< x.1/v.d$ $< 1.10^2 L. monocytogenes /g$	S
	* $2 \leq x < 6$	$x. 1/d. 1/v$ $\geq x.10^2 L. monocytogenes /g$	NS
$N > 6$	Identification porte sur cinq colonies * $0 \leq x < 2$	$< x.1/v.d$ $< 1.10^2 L. monocytogenes /g$	S
	* $x \geq 2$	$N. x/5. 1/d. 1/v$ $\geq 1.10^2 L. monocytogenes /g$	NS

Tableau XXXIII : Expression et interprétation des résultats d'analyse.

N : somme des colonies suspectes de la boîte 1 et 2.
v : volume de l'inoculum étalé sur gélose PALCAM à J0 = 0,2 ml.
d : dilution de l'échantillon = 1/10^{ème}.
x : nombre de colonies identifiées à *Listeria monocytogenes*.
S : satisfaisant. NS : Non satisfaisant.

* Identification par hybridation de sondes nucléiques.

Il s'agit d'une technique qualitative et non quantitative. Dans notre cas précis, où le volume de l'inoculum est de 0,1 ml et la dilution de l'échantillon est au 1/10 ème :

. si le test par sonde est positif alors au moins une des colonies testées était une *Listeria monocytogenes* et donc l'expression du résultat est : $>1.10^2 L. monocytogenes / g$

. si le test par sonde nucléique est négatif alors aucune des colonies testées n'appartient à l'espèce *monocytogenes* et l'expression du résultat est : $<1.10^2 L. monocytogenes / g$.

L'étude de ces techniques traditionnelles ou alternatives a montré leur efficacité pour la recherche de *Listeria* dans le saumon sous ces différents états : frais ou fumé, réfrigéré ou congelé. La sensibilité de ces différentes méthodes a pu être augmentée par l'introduction d'une étape de revivification. Celle-ci appliquée avant un dénombrement direct permet de minimiser le risque d'une estimation par défaut.

L'utilisation des méthodes alternatives représente un outil de choix pour la réalisation d'auto-contrôles en sites industriels, permettant d'évaluer la qualité microbiologique des matières premières ou du produit en cours de transformation.

Enfin, le protocole proposé pour l'analyse du saumon fumé au stade "sortie de fabrication" ou à DLC représente une technique de recherche de *Listeria* adaptée spécifiquement au saumon fumé.

La fiabilité des techniques d'analyse du saumon fumé est très importante, mais seule la connaissance des paramètres opératoires, susceptibles de limiter le développement de *Listeria*, peut procurer aux industriels un atout considérable. L'estimation des effets des facteurs représentatifs du procédé de transformation peut se faire dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle.

III. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE *LISTERIA* DANS LE SAUMON FUME.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'évolution de *L. monocytogenes* en fonction de la variation des différents facteurs rencontrés dans le saumon fumé, pour modéliser le développement de *Listeria* au cours du temps et par conséquent tenter de prédire la durée de vie de l'aliment en respectant les recommandations concernant *Listeria* .

III. 1. DETERMINATION DU PLAN D'EXPERIENCES

III. 1. 1. Choix et domaine des facteurs étudiés.

Le choix des facteurs à étudier est conditionné par les caractéristiques technologiques du produit au cours du procédé de transformation. Ainsi, nous avons sélectionné, selon les caractéristiques du produit et les données de la bibliographie, trois facteurs pouvant intervenir sur la croissance de *Listeria* à savoir : la température, le taux de sel et l'intensité de fumage.

La température est un facteur incontournable quel que soit le micro-organisme étudié, puisqu'il conditionne le développement bactérien.

Dans les conditions de laboratoire, la température de croissance de *L. monocytogenes* est comprise entre 3 et 45°C, avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C. Les travaux de JUNTILA *et al.* (1988) ont montré que la température minimale de croissance de *Listeria* est de 1°C voire de -0,1 à -0,4 °C, pour certaines souches (WALKER 1990). A 4°C, condition peu favorable, les temps de génération de l'ordre de 29 à 45 heures sont importants mais non négligeables (PETRAN et ZOTTOLA 1989, RYSER et MARTH 1991 c). En effet, la durée de conservation du saumon fumé étant au minimum de 21 jours permet une éventuelle multiplication de la bactérie au cours du stockage.

La température conseillée par le producteur de saumon fumé est de 4°C. Or dans les circuits de distribution, la température des meubles réfrigérés peut atteindre 6°C. De même les réfrigérateurs ménagers ne respectent pas ce critère, où la température est généralement de l'ordre de 8°C. Pour ce facteur, nous avons choisi un domaine expérimental de 4°C à 12°C, 12°C reflétant une rupture de la chaîne du froid.

Listeria est reconnue pour être résistante au sel. *Listeria* peut survivre à de fortes concentrations en NaCl de l'ordre de 25 % (ANONYME 1991 a, SHAHAMAT *et al.* 1980, HEFNAWY et MARTH 1993) et même se développer à des concentrations de l'ordre de 10% en NaCl (Bergey's Manual 1986).

De plus, plusieurs travaux ont montré que *Listeria* est capable de survivre voire de se développer dans les saumures (EKLUND *et al.* 1995).

Dans le saumon fumé, la concentration en sel est de l'ordre de 2,5 à 3,5 % (Norme AFNOR V 45 - 065).

Dans le cadre de notre étude nous avons défini le domaine expérimental entre 2 et 4% en sel.

Une des étapes caractéristiques du procédé de transformation du saumon, est le fumage à froid. Celui-ci est obtenu par combustion d'un bois dur comme le chêne ou le hêtre. Les principaux éléments de la fumée proviennent de la décomposition thermique des constituants du bois (la cellulose, l'hemicellulose et la lignine), suivie d'une oxydation des produits en résultant. Les principaux éléments produits sont de l'eau, du monoxyde de carbone, du dioxyde de carbone, des carbures d'hydrogène, des acides, des alcools, des dérivés à fonction carbonylée, et des dérivés phénoliques (MALLE 1981, ANONYME 1984).

Les phénols ont une contribution majeure à la création d'aromes particuliers mais sont également soupçonnés d'avoir une action antiseptique comme les composés acides. Les composés phénoliques ont également un pouvoir anti-oxydant leur conférant des propriétés anti-fongiques (phénols à point de fusion élevé) SOUSSANA 1990.

L'action inhibitrice du fumage a été mis en évidence sur différents micro-organismes. Un classement par ordre croissant des taux de réduction enregistrés entre les étapes "avant" et "après" fumage a été réalisé par MALLE en 1981 :

- Streptocoques D
- Coliformes
- Enterobactéries
- Coliformes fécaux
- Bacilles pyocyaniques
- Bactéries sur Baird Parker
- Lactobacilles.

L'importance de l'effet du fumage sur la qualité microbiologique nous a amené à le reproduire dans le milieu de culture utilisé pour le plan expérimental, à l'aide d' une fumée liquide. Ce produit est un condensat de fumée récupéré dans une phase aqueuse. Il est surtout employé en industrie de charcuterie (MILLET 1994, GERBER 1994). L'activité inhibitrice de ce type de condensat a été démontrée sur de nombreux micro-organismes : .

Aeromonas hydrophila, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fragi* (BOYLE *et al.* 1988), *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus oryzae* (WENDORFF *et al.* 1993), et *Listeria monocytogenes* (MESSINA *et al.* 1988, FAITH *et al.* 1992).

L'avantage de ce produit est sa solubilité dans une phase aqueuse, nous permettant un ajustement aisé dans le milieu de culture et l'obtention d'un système homogène. La quantité de fumée liquide à

ajouter a été déterminée par un dosage de phénols. La quantité de phénols requise pour un produit fini doit être \geq à 1 mg de phénols / 100 g (Norme AFNOR V 45-065). Nous avons choisi un domaine expérimental compris entre 0,5 mg / 100 ml à 2 mg de phénols / 100 ml.

III. 1. 2. Choix des conditions expérimentales.

* Le milieu : avec l'utilisation de substances inhibitrices comme le sel et la fumée liquide, nous avons opté dans le choix d'un milieu de base suffisamment riche, pour permettre à *Listeria* de surmonter ces inhibiteurs et de se développer. Pour cette raison nous avons employé la base du milieu LEB (cf Matériel et Méthodes).

*Le pH : au cours de cette expérimentation, nous avons décidé de fixer la valeur du pH du milieu de culture à 6,2, le pH du saumon variant peu au cours du procédé de transformation (KNOCKAERT 1993).

*La souche : nous avons sélectionné une souche de collection : *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115.

*La technique d'analyse : plusieurs techniques ont été envisagées pour réaliser cette expérience.

La turbidimétrie est très facile à utiliser mais impossible dans notre cas en raison du trouble intense, causé par l'addition de fumée liquide.

Le comptage par épifluorescence est rapide à réaliser mais présente un seuil de détection de l'ordre de 10^3 UFC / ml.

Le dénombrement, par étalement de 0,1 ml sur milieux gélosés, a été choisi en fonction du faible seuil de détection, de l'ordre de 10 UFC / ml.

*Le taux d'inoculation a été conditionné par le seuil de détection de la méthode utilisée pour le suivi de l'évolution de la population *Listeria*. Un taux d'inoculation de l'ordre de 10^3 - 10^4 *Listeria* / ml a été rétenu. Ce taux intermédiaire permet de visualiser une éventuelle croissance ou décroissance.

III. 1. 3. Définition du plan d'expériences.

Le plan d'expériences fait intervenir trois facteurs : le température, le taux de sel et le taux de phénols. Les domaines expérimentaux de ces facteurs étant définis dans une fourchette étroite, nous avons choisi de réaliser un plan factoriel complet et non un plan composite centré. Pour mettre en évidence d'éventuels effets quadratiques, trois niveaux pour chaque facteur ont été

déterminés. Nous obtenons donc un plan factoriel complet 3^3 , à 3 facteurs et 3 niveaux, soit 27 points expérimentaux sans la répétition du point central.

Ce plan peut se définir selon le Tableau XXXIV et donner la matrice expérimentale Tableau XXXV.

Niveaux codés	-1	0	1
Facteurs			
Température	4	8	12
NaCl	2	3	4
Phénol	0,5	1,25	2

Tableau XXXIV : Niveaux des différents facteurs utilisés pour le plan 3^3 .

III. 2. ACQUISITION DES DONNEES ET EFFETS DES DIFFERENTS FACTEURS.

Avant l'exécution totale du plan expérimental, il est généralement conseillé de réaliser quelques points bien choisis, afin de vérifier la faisabilité du plan complet. Il s'agit en outre pour la modélisation d'un système de croissance de s'assurer que tous les points déterminés dans le plan expérimental présentent bien un phénomène de croissance. De plus cette étude préliminaire a pour but de nous fournir les renseignements nécessaires permettant de planifier la totalité de l'expérience.

Nous avons donc étudié dans un premier temps les points combinant les bornes des domaines d'expérience des trois facteurs. Ces points sont situés aux sommets du cube représentant le plan expérimental dans l'espace (Fig 23). L'observation au cours de cette étude préliminaire nous a démontré l'existence de différents phénomènes d'évolution de la population *Listeria* à savoir : croissance, constance et décroissance. La faible ampleur des domaines de définition des différents facteurs ne nous permettant pas de modifier ceux-ci pour avoir un seul phénomène d'évolution ; croissance ou décroissance, nous avons choisi de réaliser l'étude permettant de compléter le plan factoriel 3^3 .

N° du traitement	Température (°C)	Taux de NaCl (%)	Taux de phénol (mg / 100 ml)
1	4	2	0,5
9	8	2	0,5
2	12	2	0,5
10	4	3	0,5
11	8	3	0,5
12	12	3	0,5
3	4	4	0,5
13	8	4	0,5
4	12	4	0,5
14	4	2	1,25
15	8	2	1,25
16	12	2	1,25
17	4	3	1,25
18	8	3	1,25
19	12	3	1,25
20	4	4	1,25
21	8	4	1,25
22	12	4	1,25
5	4	2	2
23	8	2	2
6	12	2	2
24	4	3	2
25	8	3	2
26	12	3	2
7	4	4	2
27	8	4	2
8	12	4	2

Tableau XXXV : Matrice expérimentale du plan factoriel complet 3^3 utilisée pour l'acquisition des données.

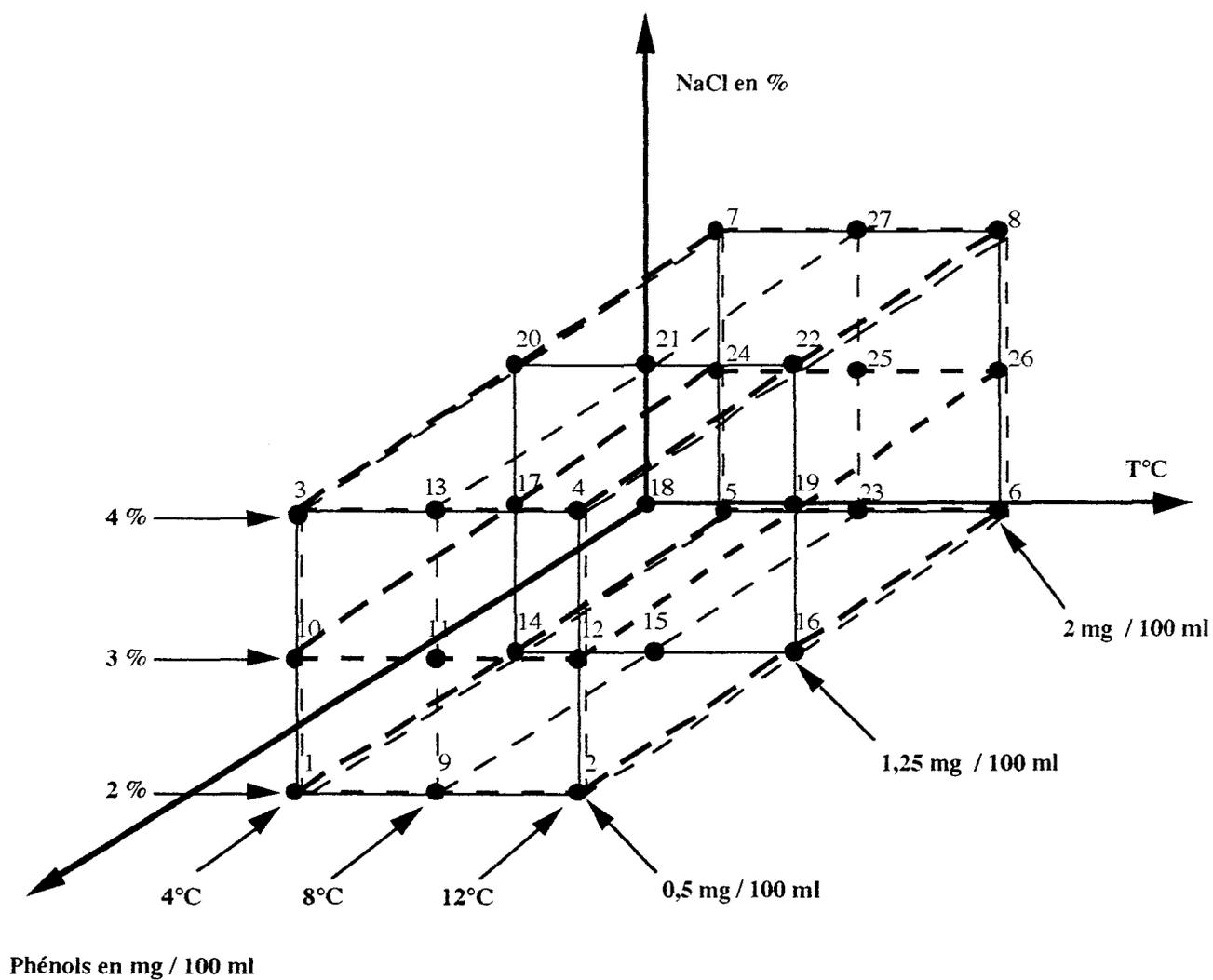


Fig 23 : Représentation dans l'espace du plan factoriel complet 3.3.

- Traitement affecté de son numéro, selon la matrice expérimentale.

III. 2. 1. Vérification des caractéristiques des milieux.

III. 2. 1. 1. Le taux de phénols.

Des dosages de phénols ont été réalisés sur différents milieux ajustés à l'aide de fumée liquide à 0,5 ; 1,25 ou 2 mg de phénols /100 ml. Les résultats des essais réalisés en double ne doivent pas différer de plus de 5% de la moyenne de deux résultats.

Les résultats sont rapportés dans le Tableau XXXVI.

Pour l'ensemble des dosages, la valeur moyenne de la quantité de phénols trouvée pour un échantillon est comprise dans l'intervalle défini par la moyenne + ou - 5% d'erreur, permettant de valider les dosages.

Pour deux dosages pratiqués sur un même échantillon une variation de l'ordre de 10 % peut être enregistrée (Tableau XXXVII).

Echantillon théoriquement à	Variation maximale entre deux dosages du même échantillon en mg /100 ml (%)*	Variation maximale entre valeurs observée et attendue en mg/100 ml (%)
0,5 mg /100 ml	0,08 (8%)	0,05 (10%)
1,25 mg /100 ml	0,13 (10,4%)	0,10 (8%)
2 mg /100 ml	0,13 (6,5%)	0,11 (5,5%)

Tableau XXXVII : Variations maximales enregistrées entre deux dosages du même échantillon et entre valeur observée et attendue.

* Les % sont calculés par rapport à la valeur attendue.

III. 2. 1. 2. Le taux de sel.

Les dosages de sel ont été réalisés plusieurs fois sur le même lot d'échantillons, afin de vérifier la teneur en sel des différents milieux préparés.

Pour l'ensemble des résultats, les valeurs moyennes des taux de sel sont comprises dans un intervalle défini par la moyenne + ou - 5% d'erreur (Tableau XXXVIII).

Les variations enregistrées pour les dosages d'un même échantillon ou entre valeurs observée et attendue sont rapportées dans le Tableau XXXIX

Equation de la gamme étalon de phénol (r ²)	Prise d'essai en ml	Do obtenue à 455 nm	mg de phénol / 100 ml		Intervalle d'erreur : m-5% < m < m+5%
			observée	attendue (%NaCl)*	
y=-0,159+49,47x (0,996)	4	0,384 0,449	0,47 0,55	0,5 (2%)	0,48 < 0,51 < 0,53
y=-0,159+49,47x (0,996)	2	0,449 0,495	1,10 1,21	1,25 (3%)	1,09 < 1,15 < 1,21
y=-0,159+49,47x (0,996)	1	0,370 0,404	1,81 1,98	2 (4%)	1,80 < 1,89 < 1,98
y=-0,058+52,86x (1,000)	4	0,464 0,459	0,54 0,57	0,5 (2%)	0,52 < 0,55 < 0,58
y=-0,058+52,86x (1,000)	2	0,558 0,521	1,28 1,29	1,25 (3%)	1,22 < 1,28 < 1,34
y=-0,058+52,86x (1,000)	1	0,407 0,402	1,97 2,08	2 (4%)	1,92 < 2,02 < 2,12
y=-0,204+49,24x (0,999)	1	0,423 0,422	2,06 2,05	2 (4%)	1,95 < 2,05 < 2,16
y=-0,204+49,24x (0,999)	1	0,434 0,426	2,11 2,07	2 (2%)	1,99 < 2,09 < 2,20
y=-0,204+49,24x (0,999)	4	0,376 0,398	0,45 0,48	0,5 (2%)	0,44 < 0,47 < 0,49
y=0,385+50,52x (0,999)	1	0,410 0,367	2,11 1,89	2 (2%)	1,9 < 2 < 2,1
y=0,385+50,52x (0,999)	1	0,387 0,351	1,99 1,81	2 (4%)	1,80 < 2 < 1,99
y=0,385+50,52x (0,999)	2	0,520 0,535	1,33 1,37	1,25 (4%)	1,28 < 1,35 < 1,41

Tableau XXXVI : Dosages de phénols sur les milieux représentant les différentes combinaisons utilisées. * Taux de sel utilisé dans la combinaison.

Lot	Volume de thiocyanate à 0,098 N	% de NaCl		Intervalle d'erreur $m-5\%m < m < m+5\%m$
		Observé	Attendu	
1	6,2	2,29		
	6,4	2,18		
	6,4	2,18	2	2,09 < 2,20 < 2,31
	6,4	2,18		
	3,1	4,07		
	3	4,13		
	3	4,13	4	3,90 < 4,11 < 4,32
	3,1	4,13		
2	6,5	2,12	2	2,04 < 2,15 < 2,25
	6,4	2,18		
	4,6	3,21	3	3,07 < 3,24 < 3,4
	4,5	3,27		
	3	4,13	4	3,89 < 4,1 < 4,3
	3,1	4,07		

Tableau XXXVIII : Dosages de NaCl sur les milieux utilisés, pour la réalisation du plan factoriel complet.

Le lot 1 correspond aux milieux de l'étude préliminaire (sommets du cube).

Le lot 2 correspond aux milieux de l'étude complémentaire.

Echantillon théoriquement à % (p/v) en NaCl	variation maximale entre dosages d'un même échantillon en g/100 ml (%)*	
	Lot 1	Lot 2
2	0,11 (5,5%)	0,06 (3%)
3		0,06 (2%)
4	0,06 (1,5%)	0,06 (1,5%)

	variation maximale entre valeurs observée et attendue	
2	0,20 (10%)	0,15 (7,5%)
3		0,24 (8%)
4	0,1 (2,5%)	0,1 (2,5%)

Tableau XXXIX: Variations maximales enregistrées entre deux dosages de sel et entre valeurs observée et attendue.

* Les % sont calculés par rapport à la valeur attendue.

La bonne reproductibilité des dosages est démontrée avec une variation de 0,06 à 0,1 % (p/v) en NaCl. L'erreur maximale calculée entre valeurs observée et attendue n'excède pas 10% et elle est obtenue pour le plus faible taux de sel 2% (p/v).

Dans l'ensemble, les valeurs fixées par le plan expérimental ont été respectées.

III. 2. 1. 3. Le pH.

Le pH des milieux utilisés pour les différents traitements a été vérifié avant inoculation. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le Tableau XXXX.

La variation maximale enregistrée sur le pH fixé à 6,2 est de l'ordre de 0,3 unité pH.

Le suivi du pH au cours de l'incubation révèle une variation de celui-ci quand une croissance est observée. Cette variation comprise entre 0,8 et 1,24 unités pH semble liée au développement de *Listeria* et pourrait expliquer l'allure de la courbe d'évolution, avec l'enregistrement d'un maximum de l'ordre de 8 unités log, suivi d'une décroissance.

Dans les autres cas (constance et décroissance), le pH reste de l'ordre de 6.

Tableau XXXX: Récapitulatif de quelques caractéristiques des points du plan factoriel 3³.

N° du traitement	T °C	Taux de NaCl %	Taux de phénols mg/10ml	Taux inoculation	pH			Maxima observés	
					initial	7 jours	35 jours	log N UFC/ml	temps en H
1	4	2	0,5	3,98	6,19	6,21	6,10		
9	8	2	0,5	3,89	6,21	6,11	5,06	8,53	219
2	12	2	0,5	3,51	6,20	4,61	nd	8,62	265
10	4	3	0,5	3,91	6,18	6,23	6,10	6,17	866
11	8	3	0,5	3,85	6,20	6,20	4,97	8,36	291
12	12	3	0,5	3,99	6,17	5,73	5,08	8,77	196
3	4	4	0,5	3,74	6,2	6,20	nd		
13	8	4	0,5	4,02	6,20	6,20	4,96	8,27	291
4	12	4	0,5	4,04	6,20	6,11	4,96	8,44	291
14	4	2	1,25	4,07	6,19	6,22	6,12		
15	8	2	1,25	3,91	6,19	6,21	5,03	8,04	364
16	12	2	1,25	3,91	6,17	6,09	4,95	8,36	219
17	4	3	1,25	4	6,19	6,20	6,07		
18	8	3	1,25	3,99	6,20	6,22	4,97	8,39	464
19	12	3	1,25	4,02	6,20	6,22	4,94	8,34	291
20	4	4	1,25	3,94	6,20	6,22	6,08		
21	8	4	1,25	3,97	6,18	6,21	5,37	7,91	866
22	12	4	1,25	3,94	6,21	6,21	4,96	8,32	464
5	4	2	2	3,70	6,17	6,11	nd		
23	8	2	2	3,95	6,21	6,20	6,03		
6	12	2	2	4,02	6,18	6,22	4,99	8,33	675
24	4	3	2	3,95	6,19	6,3	6,18		
25	8	3	2	3,96	6,21	6,22	6,07		
26	12	3	2	3,98	6,19	6,20	5,00	8,29	552
7	4	4	2	3,69	6,17	6,11	5,00		
27	8	4	2	3,53	6,20	6,2	nd		
8	12	4	2	3,32	6,19	6,05	nd		

nd : non déterminé.

III. 2. 2. Evolution de *Listeria monocytogenes* dans les différents traitements.

L'évolution de *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, dans les différents traitements sélectionnés, est rapportée en fonction du taux de phénols à 0,5 mg, 1,25 mg, 2 mg / 100 ml respectivement présentées sur les Figures 24, 25, 26.

L'avantage de ce type de présentation est la visualisation très aisée des effets des différents facteurs sur le développement de *Listeria*.

III. 2. 2. 1. Effet de la température.

Une lecture de gauche à droite des Figures 24, 25, 26 met en évidence l'effet de la température.

A 4°C aucune croissance n'est observée et la combinaison avec un taux de phénols à 2 mg /100 ml entraîne même une décroissance.

A 8°C une croissance est observée sauf pour les combinaisons intégrant un taux de phénols à 2 mg /100 ml.

A 12°C, la croissance est observée dans la majorité des cas sauf pour la combinaison 2 mg phénol/ 100 ml et 4% NaCl.

La multiplication de *L. monocytogenes* à 8 et 12°C a déjà été rapportée par RYSER et MARTH (1991 c) dans des milieux comme le lait entier ou écrémé, avec des temps de génération de l'ordre de 8 à 15 heures à 8°C et de 4 à 7 heures pour une température de 13°C. Par contre, ces mêmes auteurs constatent dans les milieux cités précédemment une croissance à 4°C avec des temps de génération compris entre 29 et 45 heures. Cette croissance à 4°C est confirmée par les travaux de BARBOSA *et al.* (1994) pour 125 souches de *Listeria* dans le milieu de laboratoire TSBYE (Tryptose Soy Broth Yeast Extract), qui n'est autre que la base du milieu LEB utilisée pour notre plan expérimental. Cependant, dans notre expérience cette croissance n'est pas observée.

L'augmentation de la température permet le développement de *Listeria*, mais cet effet se fait moins sentir avec un taux élevé en phénols. Dans le cas présent, une faible température de 4°C semble un facteur facile à mettre en oeuvre pour limiter le développement de *Listeria*.

III. 2. 2. 2. Effet de la fumée liquide.

L'importance de l'effet de la fumée liquide, suivie par la quantité de phénols en mg / 100 ml de milieu, est mise en évidence par l'observation de phénomènes extrêmes :

croissance :	0,5 mg de phénols /100 ml ; 8°C ; 4% NaCl
peu ou pas de croissance :	1,25 mg de phénols /100 ml ; 8°C ; 4% NaCl
décroissance :	2 mg de phénols /100 ml ; 8°C ; 4% NaCl.

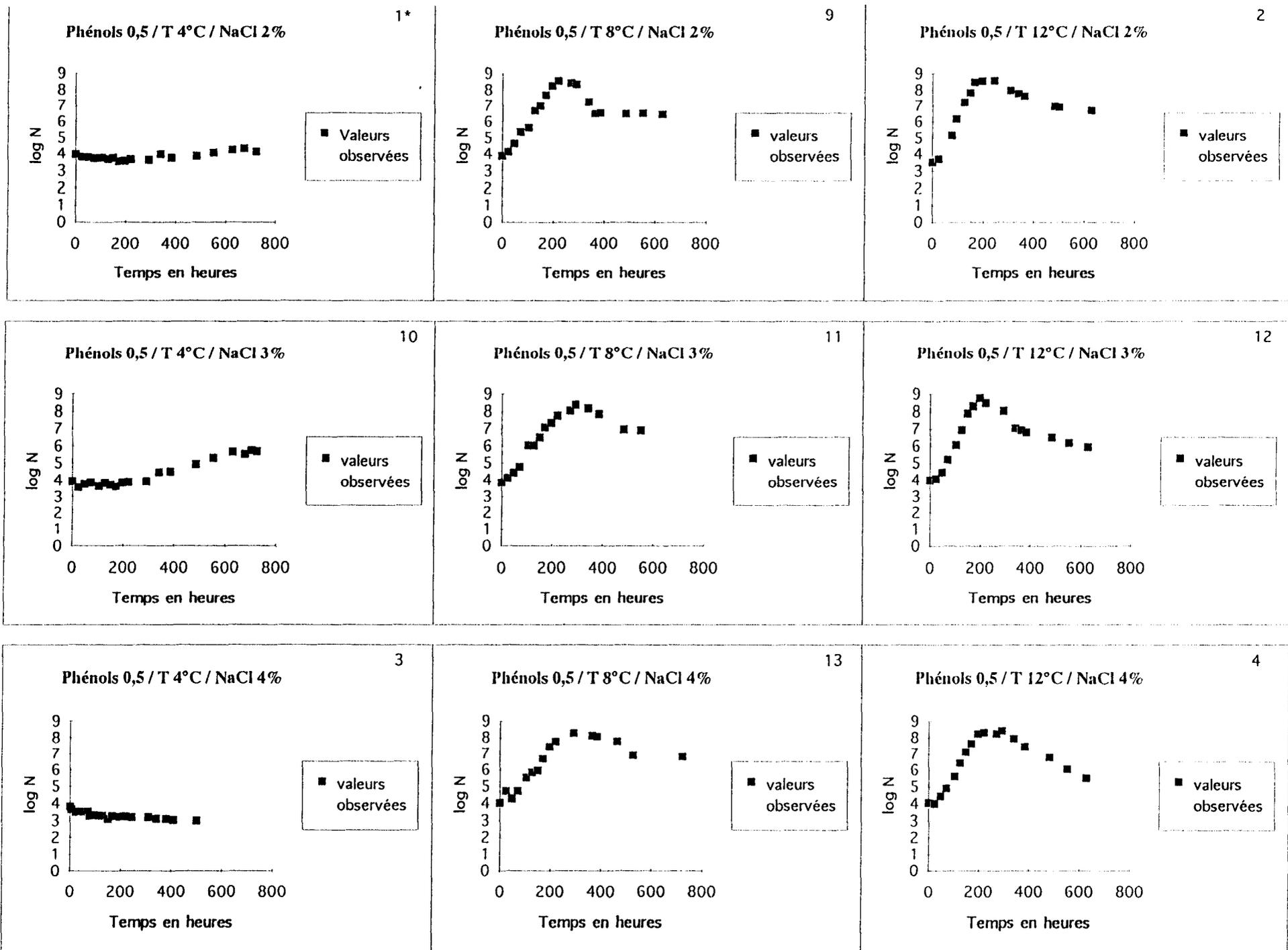


Fig 24 - Evolution dans la base LER de *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, en fonction du taux de sel et de la Température, à 0,5 mg de phénols / 100ml. * : N° du traitement

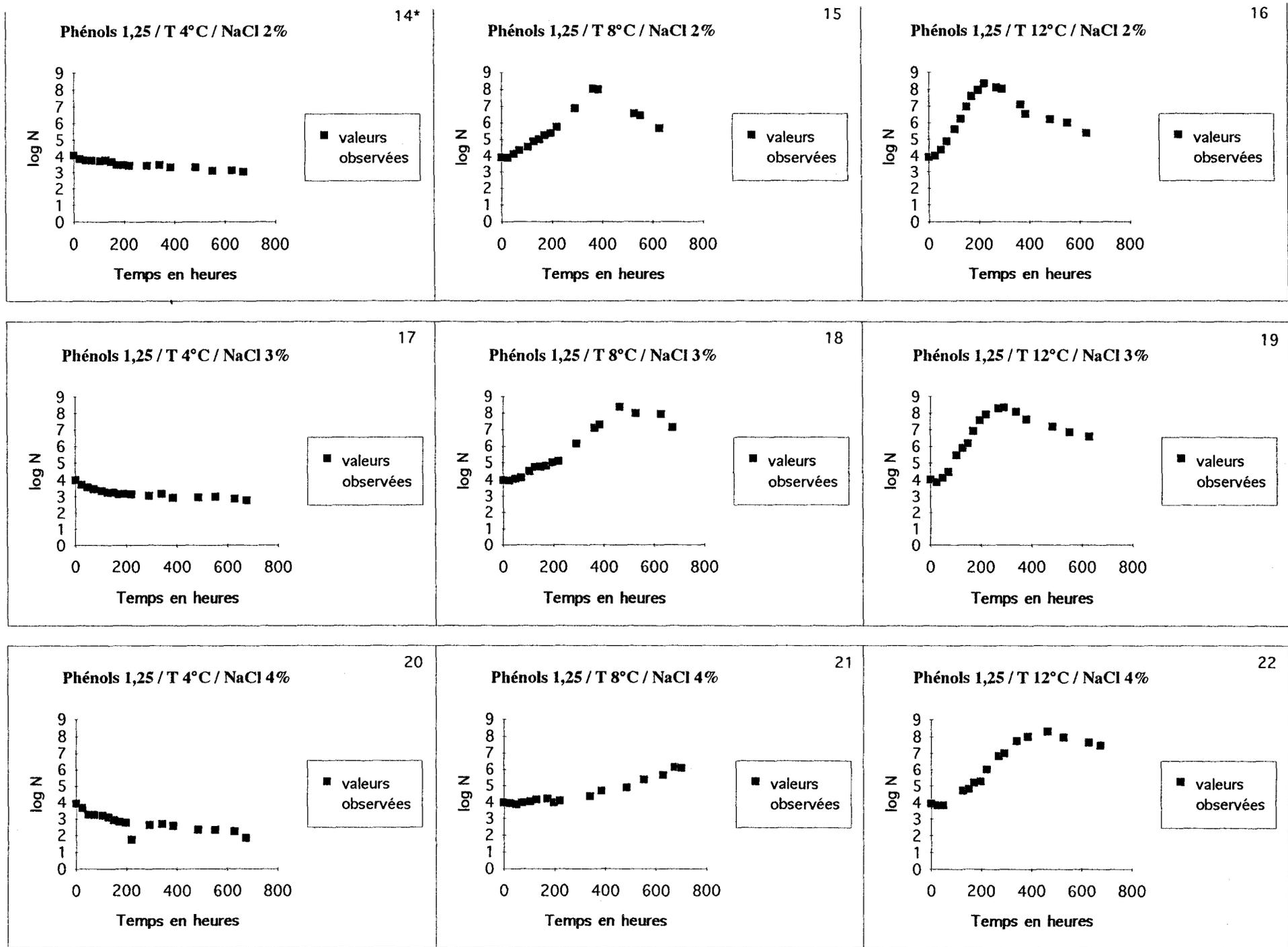


Fig 25 : Evolution dans la base LEB de *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, en fonction du taux de sel et de la Température, à 1,25 mg de phénols / 100ml. * : N° du traitement

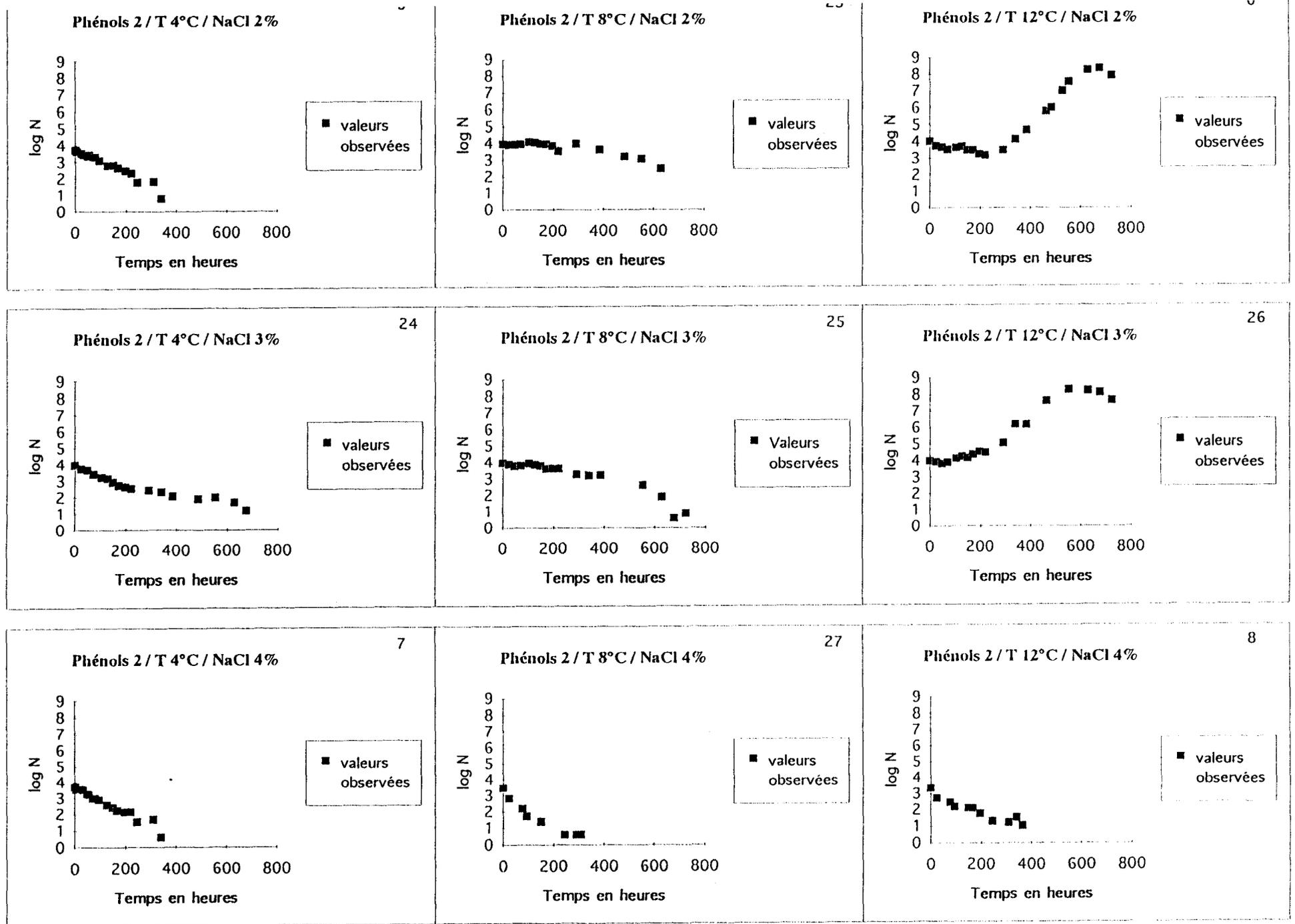


Fig 26 : Evolution dans la base I FB de *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, en fonction du taux de sel et de la Température, à 2 mg de phénols / 100ml. * : N° du traitement

L'effet des phénols s'accompagne, dans le cas des croissances à 12°C (0,5 à 2 mg de phénols / 100 ml) d' un décalage dans le temps du maximum du log N. Par exemple, pour les combinaisons suivantes :

0,5 mg phénol /100 ml ; 12°C ; 3% NaCl

1,25 mg phénol /100 ml ; 12°C ; 3% NaCl

2 mg phénol /100 ml ; 12°C ; 3% NaCl

le maximum du log N est enregistré respectivement à : 196, 291, 552 heures.

Il semble intéressant de contrôler ce taux de phénols, représentatif de l'intensité du fumage, pour tenter d'inhiber le développement de *Listeria*. En effet, les traitements ne présentant que 0,5 et 1,25 mg de phénols /100 ml ne permettent pas une inhibition et autorisent même le développement de *Listeria*., à des températures de 8 et 12°C

L'influence du facteur phénols a déjà été mise en évidence par KNOCKAERT (1993) sur la flore total du saumon fumé. Un taux minimum de 0,8 mg de phénols / 100 g de saumon permet de maintenir la flore totale en dessous de la valeur limite de 10^6 Bactéries /g, après 15 jours de stockage à 2°C.

FAITH *et al.* (1992) ont mis en évidence, avec des concentrations en phénols beaucoup plus importantes, une mortalité de *L. monocytogenes* avec une perte de 5 log en 1 jour pour un taux de phénols de l'ordre de 300 ppm (30 mg / 100 ml) et de 3 log en 5 jours pour un taux de phénols de 200 ppm (20 mg / 100 ml).

Actuellement, en raison de la lourdeur des dosages de phénols, ce facteur n'est pas contrôlé de façon aussi systématique que le taux de sel. Ce critère est fixé par la norme AFNOR NF V 45 - 065 à une valeur limite inférieure de 1 mg / 100 g.

L'augmentation du taux de phénols a tendance à inhiber le développement de *Listeria* , mais cet effet dépend également des facteurs température et taux de sel.

III. 2. 2. 3. Effet du sel.

Une lecture du haut vers le bas des Figures 24, 25, 26 permet de visualiser l'effet du sel. Le taux de sel semble le facteur le moins influant sur le développement de *Listeria*. Un passage de 2, à 3 ou à 4% NaCl affecte peu la croissance de *Listeria* , pour un taux de phénols de 0,5 mg /100 ml.

L'effet de ces faibles concentrations en sel n'est pas surprenant. En effet, les travaux réalisés par Mc CLURE *et al.* (1989) ont montré clairement que *L. monocytogenes* est capable de tolérer de fortes concentrations en sel dans un intervalle de pH défini. *Listeria* peut croître à 10% de NaCl à 35°C pour un pH neutre. A 25°C la croissance est observée en présence de 9,9 % NaCl pour un pH compris entre 6,6 à 7,9 alors qu'à 20°C elle ne l'est plus au delà de 8,8 % NaCl.

Sur un substrat saumon, PETERSON *et al.* (1993) ont mis en évidence à 10°C une multiplication de *L. monocytogenes* pour des concentrations en NaCl de 3 à 6%.

Avec un taux de phénols de 1,25 mg / 100 ml, l'effet sel est plus marqué avec un décalage dans le temps du maximum de log N. Exemples :

1,25 mg phénols / 100 ml ; 8°C ; 2% NaCl	291 H
1,25 mg phénols / 100 ml ; 8°C ; 3 % NaCl	364 H
1,25 mg phénols / 100 ml ; 8°C ; 4% NaCl	866 H
1,25 mg phénols / 100 ml ; 12°C ; 2% NaCl	219 H
1,25 mg phénols / 100 ml ; 12°C ; 3 % NaCl	291 H
1,25 mg phénols / 100 ml ; 12°C ; 4% NaCl	464 H

Dans les cas extrêmes combinant un fort taux de phénols 2 mg /100 ml et 4 %NaCl l'effet sel est nettement visible :

- 2 mg de phénols /100 ml ; 12°C ; 4% NaCl présente une décroissance alors que la combinaison à 2 et 3 % NaCl présente une croissance
- 2 mg de phénols /100 ml ; 8°C ; 4% NaCl présente une décroissance plus rapide que les combinaisons intégrant 2 et 3 % NaCl.

III. 2. 2. 4. Les interactions entre facteurs.

Il est difficile de déterminer les interactions entre les différents facteurs, mais il est possible de soupçonner une interaction température et phénols.

A 8°C, pour des taux en phénols de 0,5 et 1,25 mg/100 ml, l'effet de la température est plus important que l'effet des phénols puisque l'allure générale des courbes est une croissance. Alors que pour un taux de phénols plus élevé (2 mg / 100 ml) la tendance s'inverse, pour passer à un phénomène de décroissance montrant l'effet primordial des phénols.

A 2 mg de phénols /100 ml, pour les températures de 4 et 8°C l'allure générale des courbes est une décroissance (effet primordial des phénols) alors qu'à 12°C la tendance change, avec un phénomène de croissance à 2 et 3 % NaCl (effet primordial de la température). Par contre, la combinaison 2 mg phénols / 100 ml ; 12°C ; 4% NaCl, semble mettre en évidence une interaction phénol / sel puisque la tendance de la décroissance, due aux phénols à 4 et 8°C, est retrouvée

L'effet du sel n'est pas homogène dans l'ensemble des traitements et semble dépendre des autres facteurs. HEFNAWY et MARTH (1993) ont montré que la température a une grande influence sur le comportement de *Listeria* en présence de sel. A 13°C, la bactérie croit rapidement avec un taux de sel de 1 à 2 %. Par contre, 4 °C augmente l'action inhibitrice du sel, avec une

décroissance suivie d'une croissance. SHAHAMAT *et al.* (1980) ont également rapporté l'influence du couple sel / température sur la survie de *Listeria*. Le temps de survie pour une même concentration en sel passe de 5 jours pour 37°C, à 32 jours pour 22°C et à plus de 132 jours pour 4°C.

Au cours de leurs essais sur saumon, PETERSON *et al.* (1993) ont également rencontré cette interaction sel / température. Ils observent une croissance à 5°C en présence de 3 à 5 % en NaCl et l'absence de croissance à 6% NaCl.

Ces observations montrent l'importance de l'influence du taux de sel combiné à d'autres facteurs sur l'évolution de *Listeria*.

L'ensemble des caractéristiques de l'évolution de *Listeria* en fonction des différents facteurs est rapporté dans le Tableau XXXX (p 154).

Il ressort de cette étude en milieu liquide, que la température de 4°C apparait nécessaire pour limiter le développement de *Listeria*, cependant le taux de phénols semble être décisif pour amorcer un phénomène de décroissance

Une température de 4°C couplée à un taux de phénols de l'ordre de 2 mg / 100 ml permet l'observation de décroissance de la population *Listeria* dans le milieu LEB, montrant l'effet synergique de la température et d'un fort taux de phénols.

Il est important de souligner que les traitements 5, 7, 27, et 8 comportant un taux élevé en phénols de 2 mg / 100 ml, ne révèlent plus la présence de *Listeria*, recherchée à 21 jours d'incubation par la méthode AFNOR V 08-055.

L'effet de la température est important et souligne le caractère impératif d'une conservation des saumons fumés à une température aussi faible que 4°C. Cette conclusion soulève le problème du respect d'une telle température, notamment des les circuits de distribution mais également au niveau des réfrigérateurs ménagers.

III. 3. MODELISATION.

III. 3. 1. Choix des modèles : modèle "discontinu" et modèle "continu".

En raison de l'observation de différents phénomènes d'évolution de la population *Listeria*, la modélisation a été réalisée en deux temps, pour aboutir à deux modèles mathématiques. Le premier modèle non continu sur le domaine de définition est scindé en deux sous modèles l'un représentant la croissance, l'autre la décroissance. Il est appelé "discontinu".

Le deuxième modèle continu sur le domaine de définition permet la modélisation de la croissance et la décroissance. Il est appelé "continu".

III. 3. 1. 1. Modèle "discontinu".

Dans un premier sous modèle, il a été choisi de regrouper les courbes présentant une croissance (traitements :1, 2, 4, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 21, 22, 26) et de leur appliquer un modèle basé sur l'équation de Gompertz (Mc MEEKIN *et al.* 1993, SKINNER et LARKIN 1994). L'observation des courbes montre un déclin de la population après avoir atteint un maximum qui n'est pas représenté par l'équation de Gompertz et donc un terme de décroissance a été ajouté. L'équation de modélisation des courbes de croissance peut s'exprimer sous la forme (1).

$$Y = \{ \text{initial} + \text{Gompertz} \} \times \{ \text{terme de mortalité} \}$$

$$Y = \{ \text{Init} + A \exp [(- \exp (\mu e / A (L-t)+1))] \} \times \{ \exp (-kd \times t)+\text{Bas} \}$$

Y : réponse modélisée soit logN (UFC / ml)

t : temps en heures

Init ou initial : constante relative à la valeur paramétrée du taux d'inoculation

paramètres de l'équation de Gompertz : A : niveau de l'asymptote quant $t \rightarrow \infty$

μ : maximum du taux de croissance spécifique (H)

L : phase de latence en H

e : exp (1)

terme de mortalité :

kd : constante exprimant la vitesse de décroissance

Bas : relatif à la valeur atteint après la décroissance

Les paramètres A, μ , L de l'équation de Gompertz habituellement utilisés pour exprimer les données microbiologiques : taux de croissance, phase de latence, n'ont dans ce cas plus aucune réalité microbiologique puisque un terme de mortalité a été introduit dans l'équation.

Les valeurs des coefficients de chaque paramètre, en fonction des différents facteurs ayant une influence significative sur la réponse, sont rapportées dans le Tableau XXXXI . Les coefficients couplés à leurs facteurs respectifs et réintégrés dans l'équation permettent de modéliser la réponse Y en fonction du temps, selon 40 paramètres.

Dans un deuxième sous modèle, les courbes exprimant une décroissance (traitements : 3, 5, 7, 8, 14, 17, 20, 23, 24, 25, 27) ont été modélisées selon une équation établie par COLE *et al.* (1993).pour décrire une inactivation thermique de *Listeria* . Ce modèle a également été utilisé dans le cas de *Yersinia enterocolitica* cultivée en condition sub optimale de température et de pH (LITTLE *et al.* 1994).

	A		μ		L		Bas
a0*	137,3	b0	6,2 E-02	c0	-306,98	d0	-2,2E-00
a1	-1,134	b1	8,4 E-03	c1	-6,076	d1	1,9 E-01
a2	-155,7	b2	-3,6 E-02	c2	250,78	d2	3,9E-01
a3	-122,3	b3	-1,1 E-01	c3	264,34	d3	1,8E00
a11	0,277	b11	1,8 E-04	c11	0,239	d11	-1,6E-02
a22	-41,83	b22	-7,9 E-02	c22	42,46	d22	3,4E-01
a33	12,87	b33	1,0 E-02	c33	-47,42	d33	-2,7E-01
a233	-21,10	b233	-2,0E-02	c233	35,42	d233	2,3E-01
a23	214,25	b23	1,9 E-01	c23	-135,60	d23	-1,6E00
a12	-6,71	b12	-9,6 E-03	c12	-10,64	d12	-,0E-01

Tableau XXXXI : Valeurs des coefficients des paramètres A, μ , L, bas du modèle "discontinu" : cas des croissances.

*a : représente la lettre du coefficient affecté au paramètre (ici A), et les chiffres 1, 2, 3 : représentent respectivement les facteurs Température, phénols et NaCl.

Le chiffre 0 est affecté à une constante, indépendante des facteurs phénols, sel et température.

Par exemple ; dans l'expression du paramètre A les coefficients suivants interviennent :

a0 : constante intervenant dans l'expression du paramètre A

a1 : représente un effet du facteur 1 (la température)

a11 : représente un effet quadratique du facteur 1

a12 : représente une interaction entre le facteur 1 (la température) et le facteur 2 (le taux de phénols.)

a233 : représente une interaction entre le facteur 2 (taux de phénols) et l'effet quadratique du facteur 3 (sel²)

L'équation est de la forme :

$$Y = \alpha + (\omega - \alpha) / \{ 1 + \exp [4 \sigma (\tau + \log t) / (\omega - \alpha)] \}$$

α : Asymptote supérieure (log UFC / ml)

ω : Asymptote inférieure (log UFC / ml)

τ : temps où la pente est maximale (Heures)

σ : pente maximale ((log UFC / ml) / H-1)

t : temps en heures

La réponse modélisée Y est log N en UFC / ml.

Les valeurs des coefficients des paramètres α , β , σ , ω , en fonction des différents facteurs ayant une influence significative sur la réponse, sont rapportées dans le Tableau XXXXII.

Les coefficients couplés à leurs facteurs respectifs et réintégré dans l'équation permettent de modéliser la réponse Y en fonction du temps, selon 44 paramètres.

III. 3. 1. 2. "Modèle continu".

Une fonction continue a été choisie pour représenter les données expérimentales sur l'ensemble des domaines de définition. La forme générale du modèle est la suivante :

$$\log N = Y = [f1^n + f2^n]^{1/n} \quad (1)$$

Le terme f1 représente la croissance du micro-organisme observée dans la première phase de l'évolution. Ce terme est exprimé à l'aide d'une exponentielle

$$f1 = K1 \exp (\lambda_1 \cdot t) \quad (2)$$

Le déclin rencontré dans la deuxième phase de l'évolution est codé à l'aide du terme f2 faisant également intervenir une exponentielle :

$$f2 = K2 \exp (- \lambda_2 \cdot t) \quad (3)$$

L'équation globale reproduisant le profil de la biomasse est :

$$Y = \{ [K1 \exp (\lambda_1 \cdot t)]^n + [K2 \exp (- \lambda_2 \cdot t)]^n \}^{1/n} \quad (4)$$

K1 peut être exprimé en fonction de K2 :

$$K1 = [(\log No)^n - k2^n]^{1/n} \quad (5)$$

où $\log No \rightarrow \log N$ à $t = 0$

$\log No$ est considéré comme un paramètre estimé représentant la taille de l'inoculum, de l'ordre de 4.

α		ω		τ		σ	
a0	4,855	b0	-29,445	c0	10,163	d0	-0,043
a1	0,327	b1	3,153	c1	0,486	d1	-0,225
a2	-0,763	b2	-7,056	c2	-1,673	d2	0,143
a3	-0,645	b3	-1,603	c3	2,325	d3	-0,229
a11	-0,027	b11	0,075	c11	0,040	d11	0,064
a22	-0,052	b22	-0,486	c22	-0,919	d22	-1,744
a33	0,059	b33	-1,642	c33	0,094	d33	-0,376
a233	0,053	b233	-0,324	c233	-0,151	d233	0,316
a23	-0,028	b23	3,659	c23	0,667	d23	-0,181
a12	0,068	b12	0,676	c12	-0,311	d12	-0,494
a13	-0,023	b13	-0,317	c13	-0,262	d13	0,070

Tableau XXXXII : Valeurs des coefficients des paramètres α , ω , τ , σ du modèle "discontinu" : cas des décroissances.

*a : représente la lettre du coefficient affecté au paramètre (ici A), et les chiffres 1, 2, 3 : représentent respectivement les facteurs Température, phénol et NaCl.

K_2			λ_1			λ_2		
	Valeur estimée	Erreur standard		Valeur estimée	Erreur standard		Valeur estimée	Erreur standard
a0*	6,24	0,3	b1	1,62	0,1	c1	-0,6	0,1
a2	0,75	0,2	b11	-0,0077	0,007	c11	-0,1	0,01
a3	0,26	0,09	b2	-2,13	0,4	c2	19,3	1,5
			b3	-0,7	0,4	c22	-5,8	0,5
			b33	-0,17	0,07	c3	-7,5	0,7
			b12	0,08	0,04	c33	1	0,1
						c12	0,37	0,06
						c13	0,35	0,04

Tableau XXXXIII : Valeurs des coefficients des paramètres du modèle "continu".

*a : représente la lettre du coefficient affecté au paramètre (ici K_2), et les chiffres 1, 2, 3 : représentent respectivement les facteurs Température, phénol et NaCl.

$K_2, \lambda_1, \lambda_2$ sont exprimés en fonction des facteurs étudiés :

température	(TE)
NaCl	(NL)
Phénol	(PL)

Seuls les termes significatifs selon un test du χ^2 interviennent dans le système d'équations : $K_2, \lambda_1, \lambda_2$.

$$K_2 = a_0 + a_2 \cdot PL + a_3 \cdot NL \quad (6)$$

$$\lambda_1 = \exp (b_1 \cdot TE + b_{11} \cdot TE^2 + b_2 \cdot PL + b_3 \cdot NL + b_{33} \cdot NL^2 + b_{13} TE \cdot NL) / m \quad (7)$$

$$\lambda_2 = \exp (c_1 \cdot TE + c_{11} \cdot TE^2 + c_2 \cdot PL + c_{22} \cdot PL^2 + c_3 \cdot NL + c_{33} \cdot NL^2 + c_{12} \cdot TE \cdot PL + c_{13} \cdot TE \cdot NL) / m \quad (8)$$

Pour obtenir une valeur positive des valeurs λ_1 et λ_2 , une fonction exponentielle a été choisie. En contre partie, un terme correctif : "m" a été introduit pour diminuer l'effet de l'exponentielle donnant de forte valeur.

Le coefficient n toujours négatif a été fixé à -1 pour simplifier l'équation.

Les équations 6, 7, 8 réintégréés dans l'équation (4) aboutissent à l'expression finale du modèle permettant de décrire les données expérimentales, avec 17 paramètres.

La valeur estimée et l'erreur standard des paramètres $K_2, \lambda_1, \lambda_2$ sont rapportées dans le Tableau XXXXIII.

III. 3. 2. Validité des modèles.

III. 3. 2. 1. Modèle "discontinu".

Les réponses prédites et observées pour les croissances sont rapportées Fig 27.

Dans l'ensemble, l'ajustement des courbes de prédiction représente bien les courbes expérimentales. Le report des points de ces différentes croissances, des valeurs observées en fonction des valeurs prédites (Fig 28) montre un nuage de points réparti de façon homogène autour de la bissectrice, indiquant l'absence de biais dans la définition du modèle.

Seuls les valeurs prédites du traitement N° 21 (Phénols 1,25 /NaCl 4% / 8°C) présentent une variabilité importante par rapport aux valeurs observés. Celle-ci est probablement due à la forme de la courbe d'évolution où la croissance est sensiblement moins rapide que dans les autres observations.

Dans les cas de décroissance, les courbes prédites et observées rapportées Fig 29, nous amènent aux mêmes conclusions que pour les croissances. L'ajustement entre valeurs prédites et observées est visualisé d'une part par la superposition des courbes d'évolution (Fig 29), mais aussi par la répartition homogène des points autour de la bissectrice (Fig 30), impliquant une absence de biais dans l'établissement du modèle.

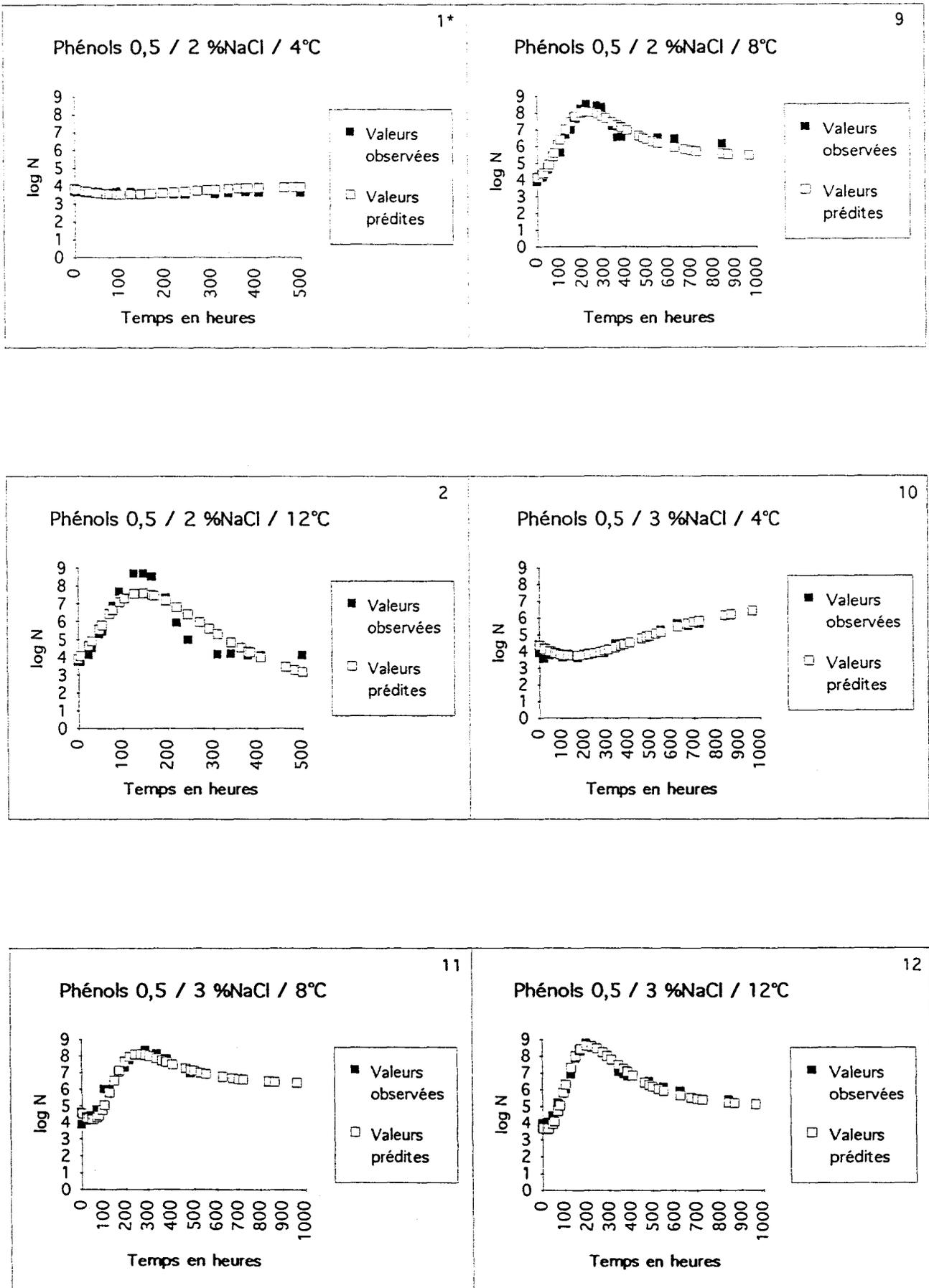


Fig 27 : Modélisation de l'évolution de *Listeria*, Modèle discontinu : cas des croissances. * : N° du traitement.

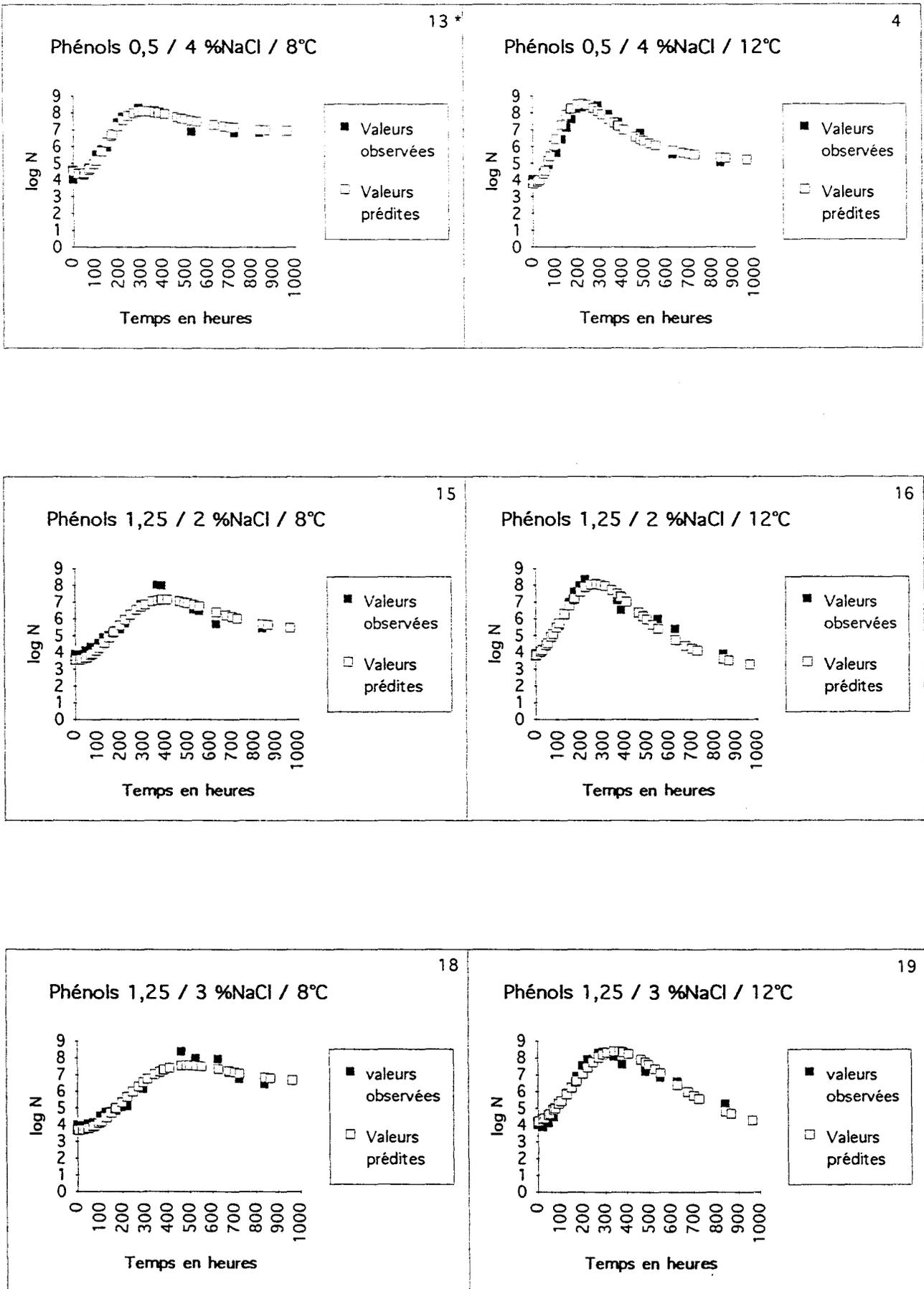


Fig 27 suite : Modélisation de l'évolution de *Listeria*, Modèle discontinu : cas des croissances. * : N° du traitement.

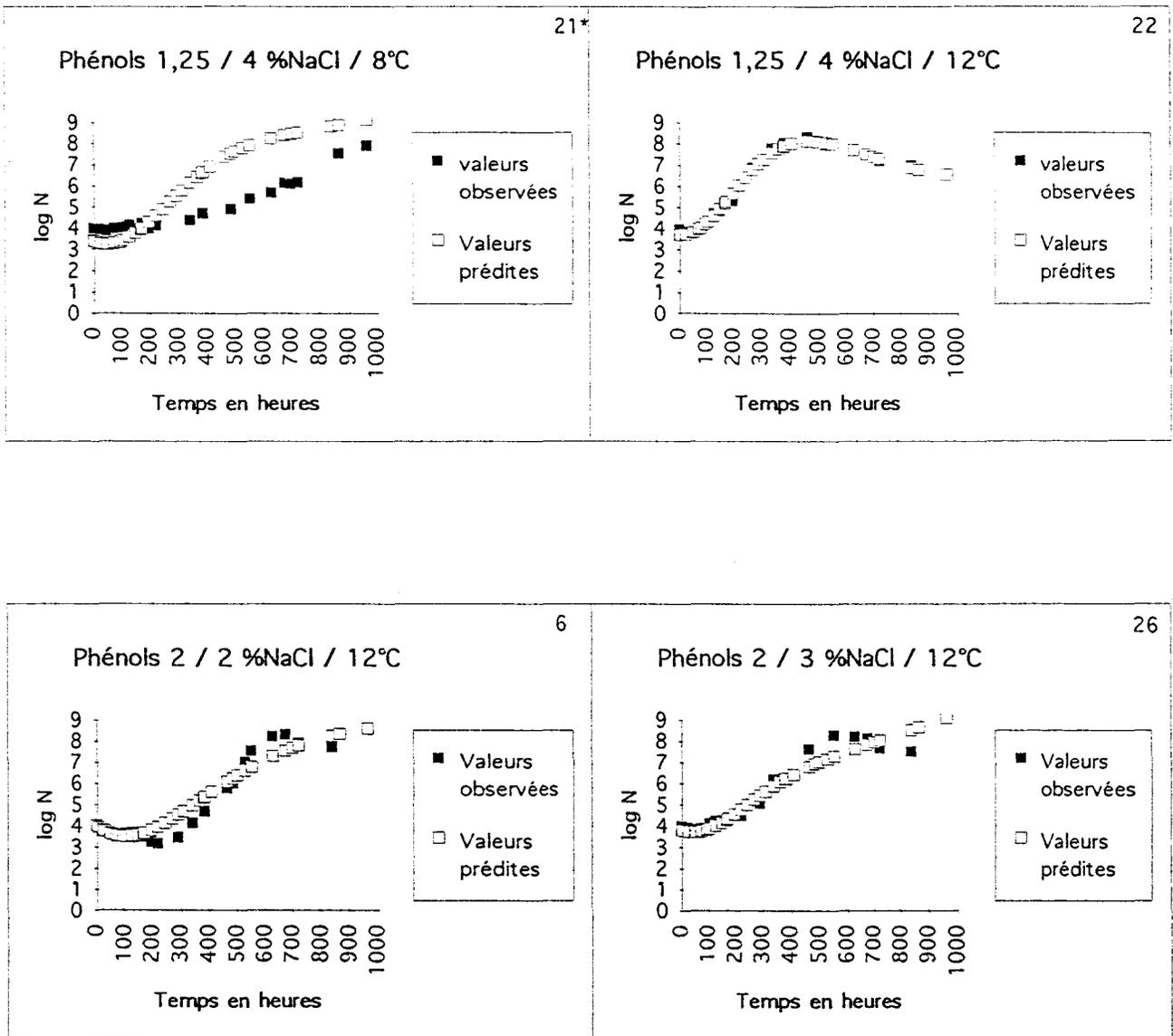
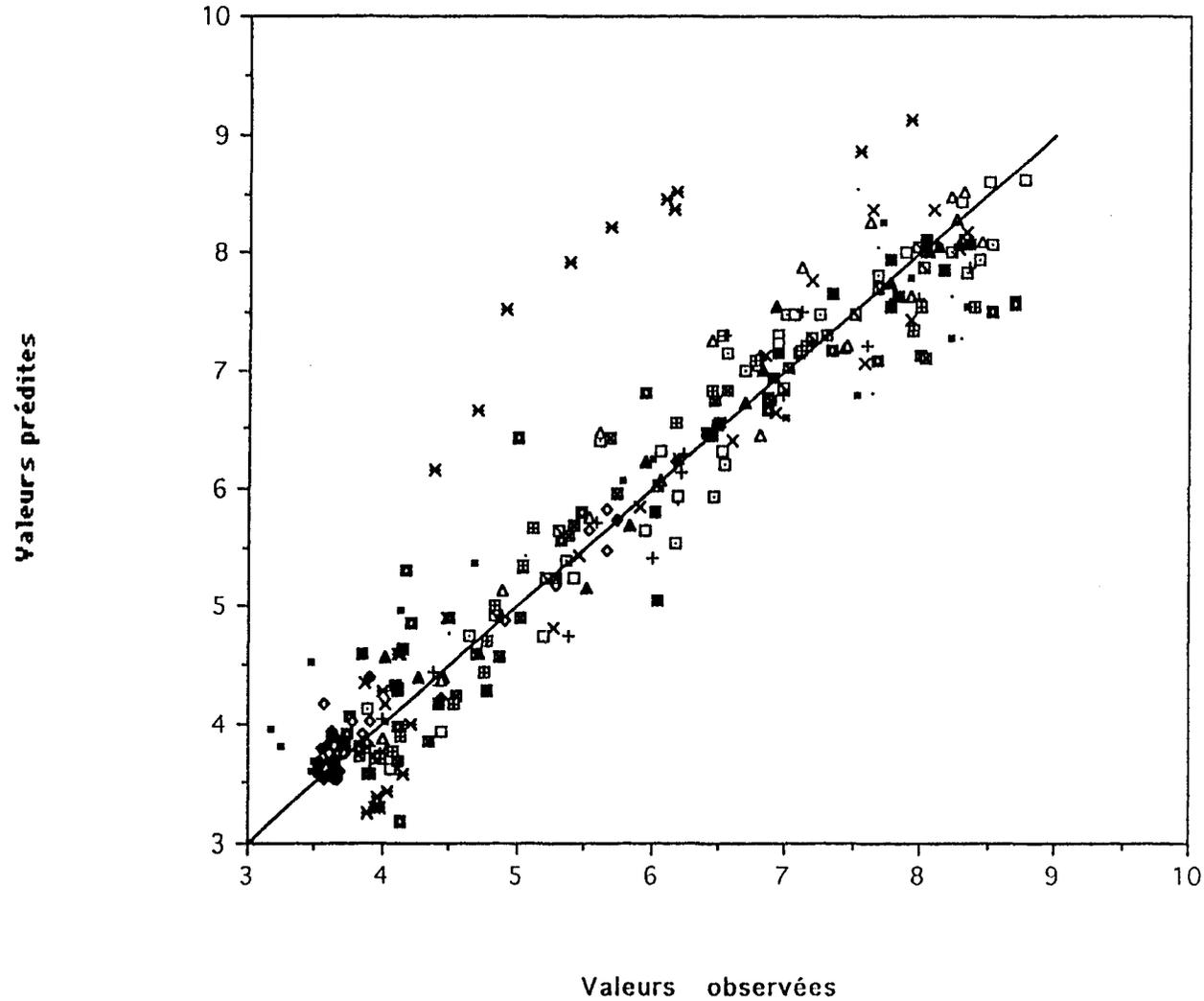


Fig 27 suite : Modélisation de l'évolution de *Listeria*, Modèle discontinu : cas des croissances. * : N° du traitement.

Fig 28 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle discontinu, du log N de Listeria en milieu LEB : cas des croissances.



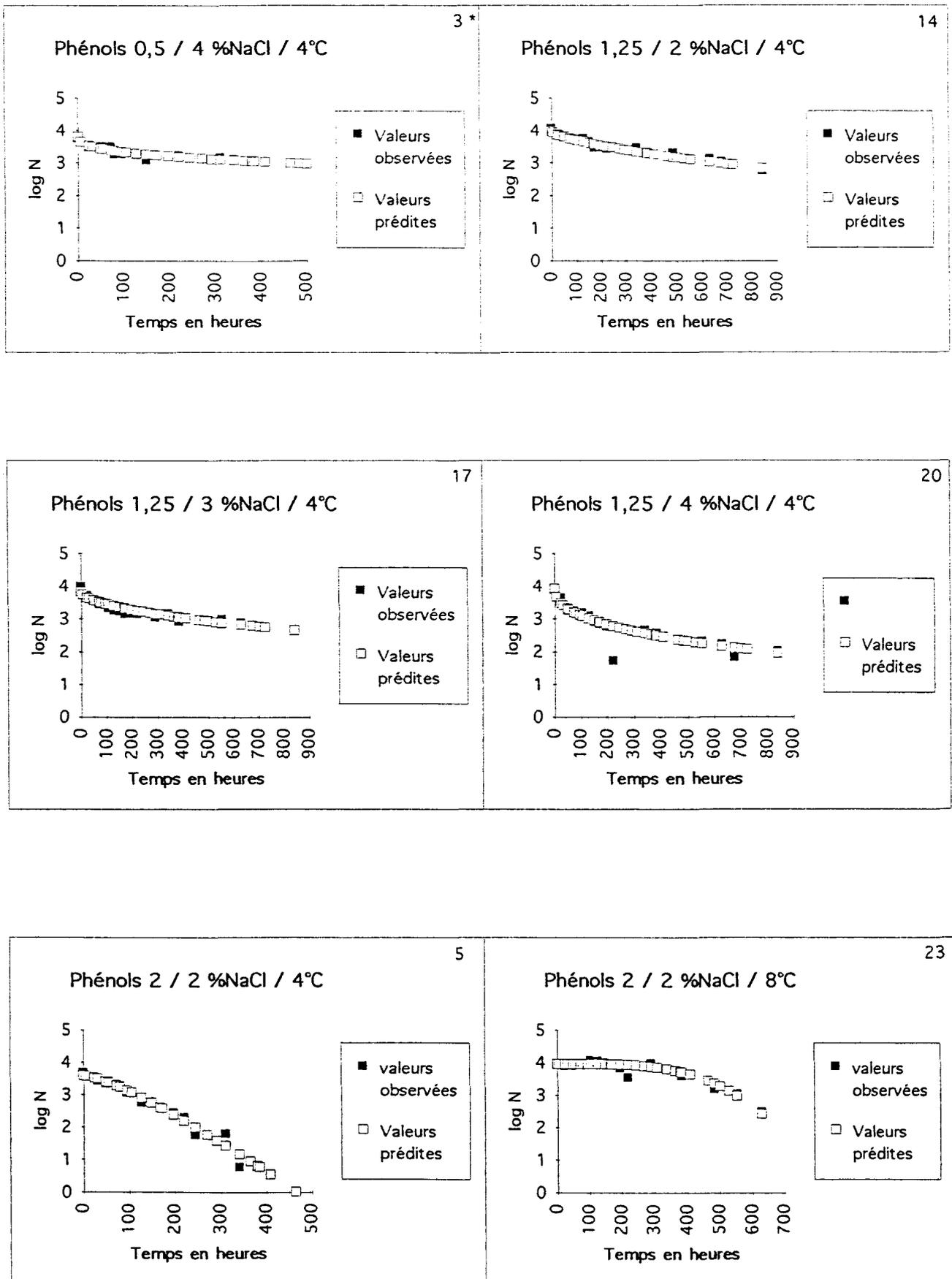


Fig 29 : Modélisation de l'évolution de *Listeria*, Modèle discontinu : cas des décroissances. * : N° du traitement.

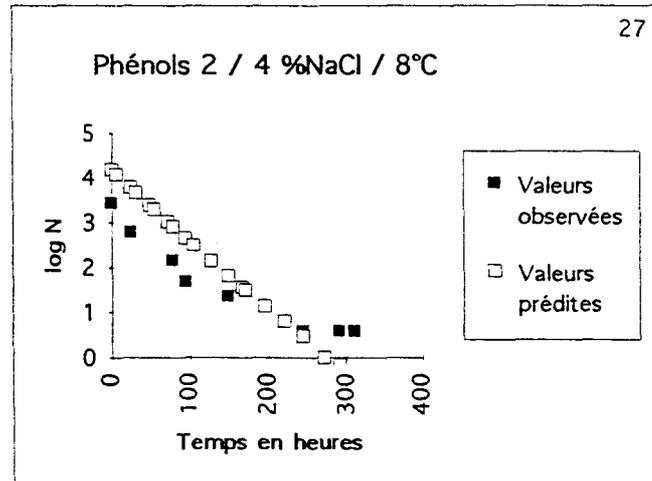
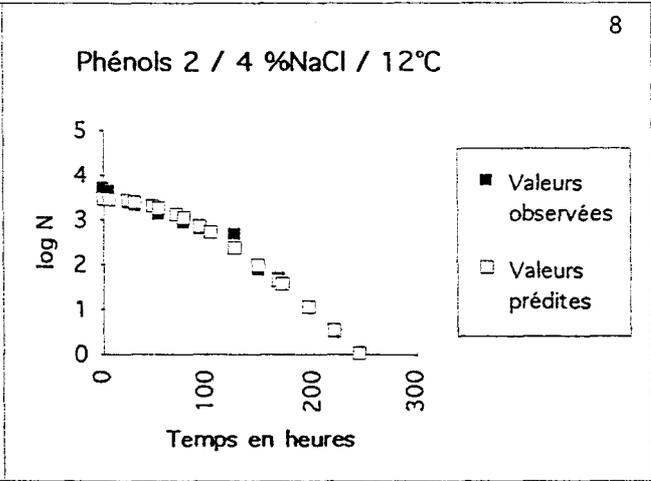
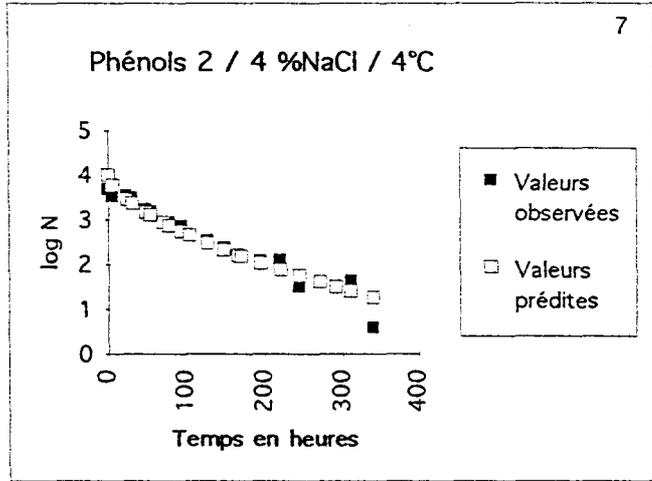
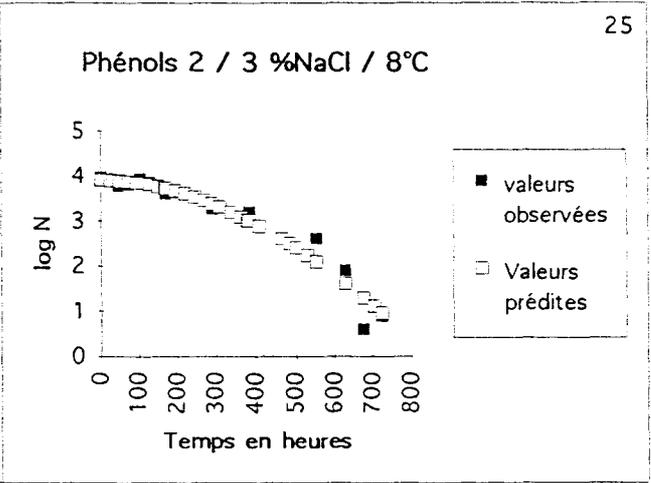
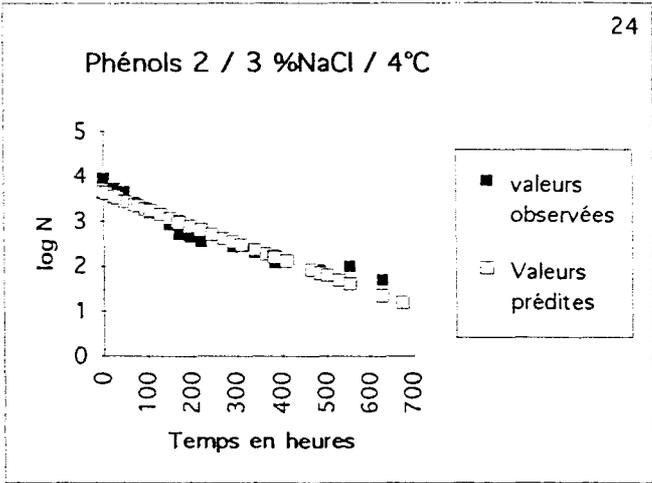
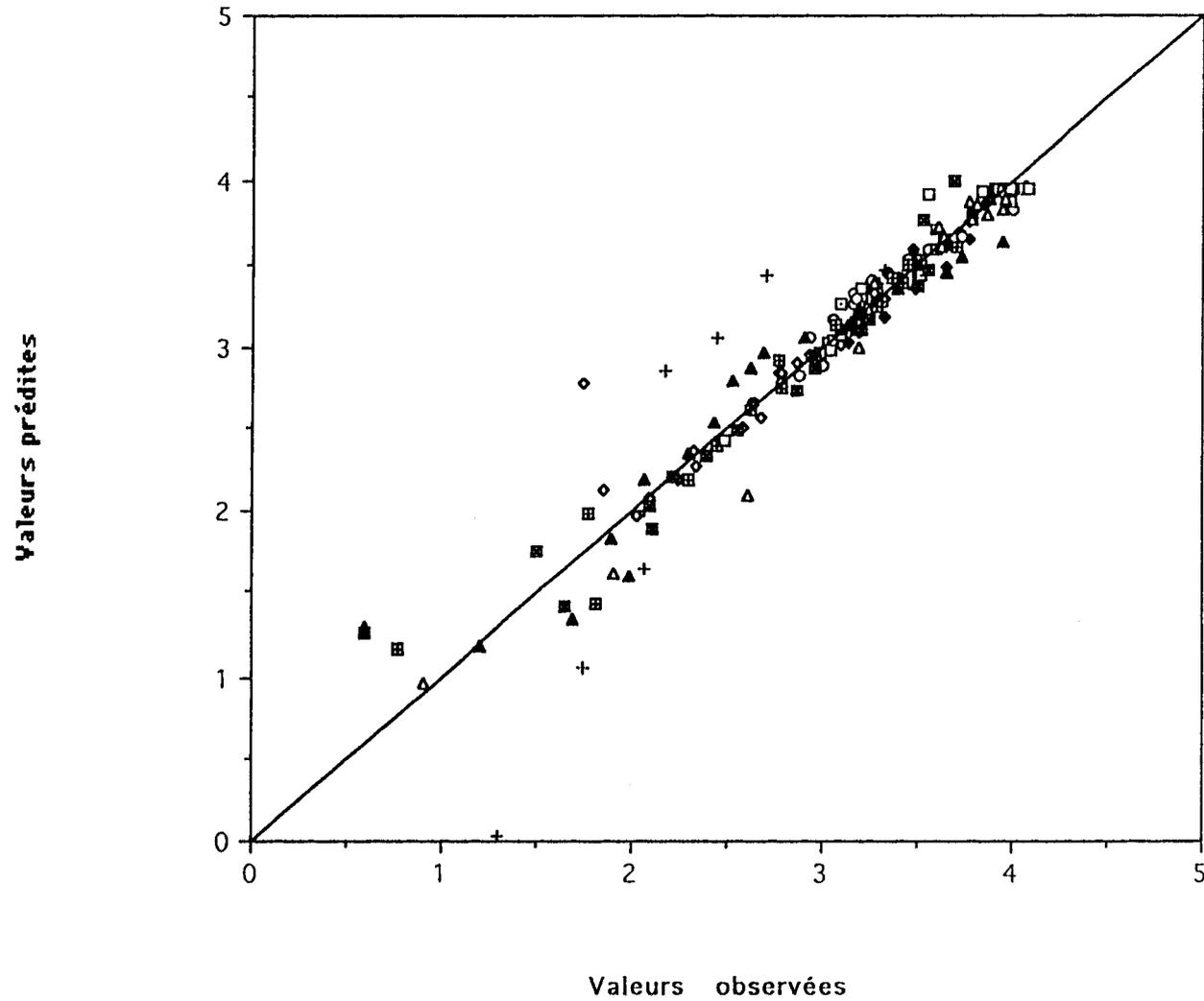


Fig 29 Suite : Modélisation de l'évolution de *Listeria*, Modèle discontinu : cas des décroissances. * : N° du traitement.

Fig 30 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle discontinu, du log N de Listeria dans le milieu LEB : cas des décroissances.



Du point de vue de la modélisation, ces deux sous modèles sont très intéressants et reproduisent de façon fiable les tendances observées. Mais du point de vue de la prédiction ces mêmes modèles sont difficilement utilisables, en raison de la non continuité du modèle sur les domaines expérimentaux choisis. En effet, à partir d'un traitement donné, il est nécessaire de connaître à priori le type d'évolution de *Listeria*, à savoir croissance ou décroissance, pour prédire une réponse ici $\log N = f(t)$.

III. 3. 2. 2. Modèle "continu".

Le deuxième modèle établi pour palier l'inconvénient majeur rencontré dans le premier modèle, permet d'obtenir les réponses prédites rapportées Figures 31, 32, 33.

Dans les cas de décroissance, les valeurs prédites sont relativement bien ajustées aux valeurs observées, puisque les courbes présentent les mêmes tendances.

Dans les cas de croissance, l'ajustement est un peu plus délicat. En effet, les maxima atteints au cours de l'évolution de *Listeria* sont sensiblement plus faibles dans le modèle que dans la réalité, sans excéder une unité log de variation.

Comme pour le modèle "discontinu", le traitement N° 21 (Phénol 1,25 / NaCl 4% / 8°C) présente un problème de modélisation important puisque la tendance prédite est inverse de la tendance observée après 350 heures. En effet, la courbe d'évolution du traitement N° 21 sans modification jusqu'à 400 Heures d'incubation, amorce une légère croissance sans excéder 2 unités log à 800 Heures.

L'absence d'autres phénomènes de croissance aussi tardive au cours de l'incubation de 800 heures dans le plan d'expériences fait que le modèle mathématique n'a pu au cours de la prévision envisager cette tendance.

Pour améliorer la sensibilité du modèle, il faudrait envisager de refaire l'expérimentation pour vérifier la réalité de la tendance observée ou supprimer la courbe du traitement N° 21 au cours de l'élaboration du modèle.

La phase de déclin observée dans les courbes expérimentales, après atteinte du maximum, est également moins bien représentée dans ce modèle que dans le modèle N° 1, sans toutefois porter préjudice à la validité du modèle. Le report des valeurs observées en fonction des valeurs prédites montre un nuage de points bien réparti au voisinage de la bissectrice pour les valeurs du log N comprises entre 0 et 7 unités log. Pour les valeurs supérieures à 7 unités log, un léger biais peut être observé. Seuls les points représentatifs du traitement N° 21 présente une forte divergence (Fig 34).

Le deuxième modèle mathématique, bien que moins fiable dans la modélisation des valeurs observées, reste le seul exploitable du point de vue de la prévision de la réponse, soit $\log N = f(t)$, pour une combinaison donnée du taux de phénols / taux de sel / T°C, dans la limites des

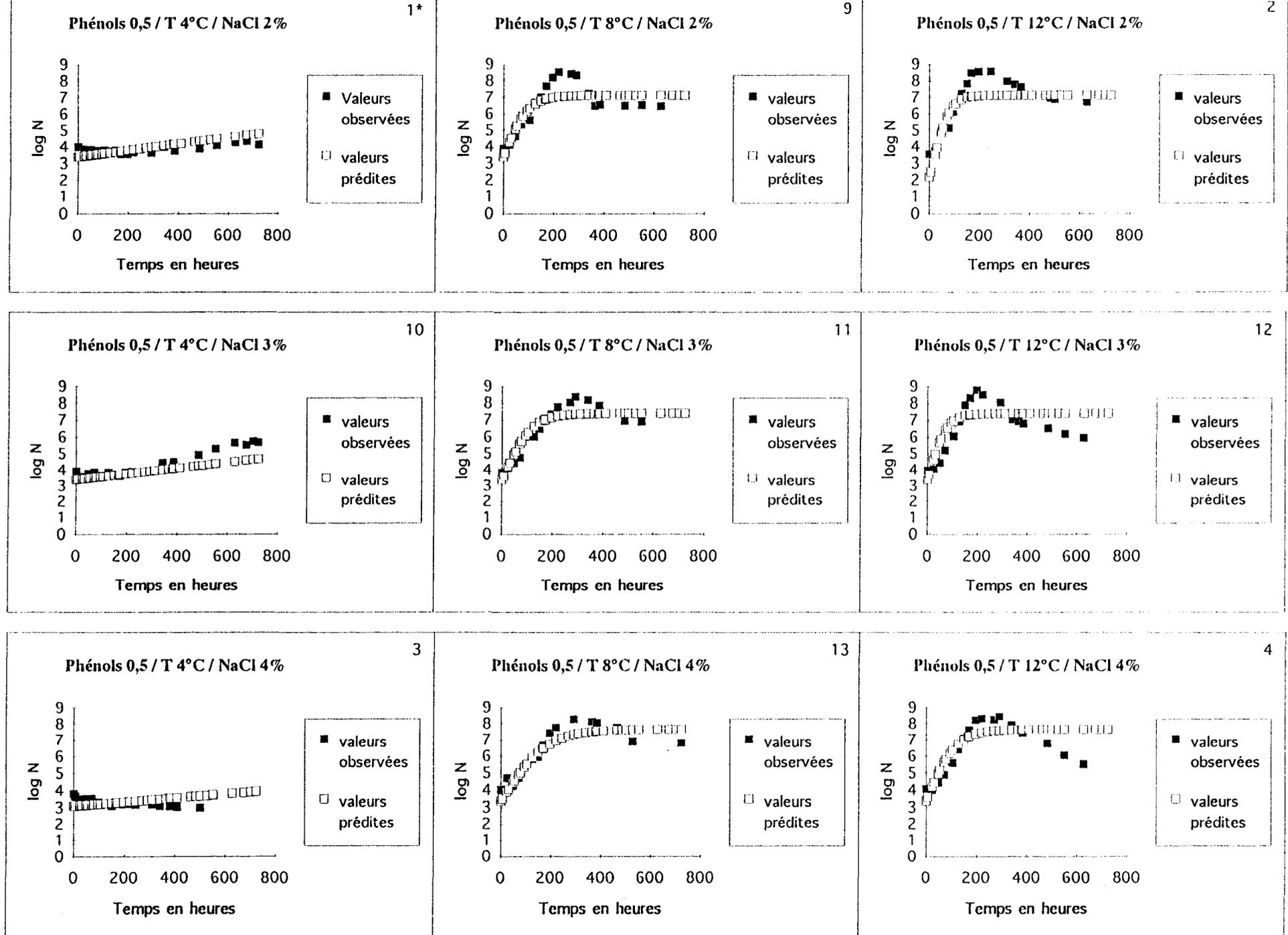


Fig 31 : Modèle continu : évolution de *Listeria* en fonction de la température et du taux de sel, à 0,5 mg de phénols/100 ml.

* : N° du traitement.

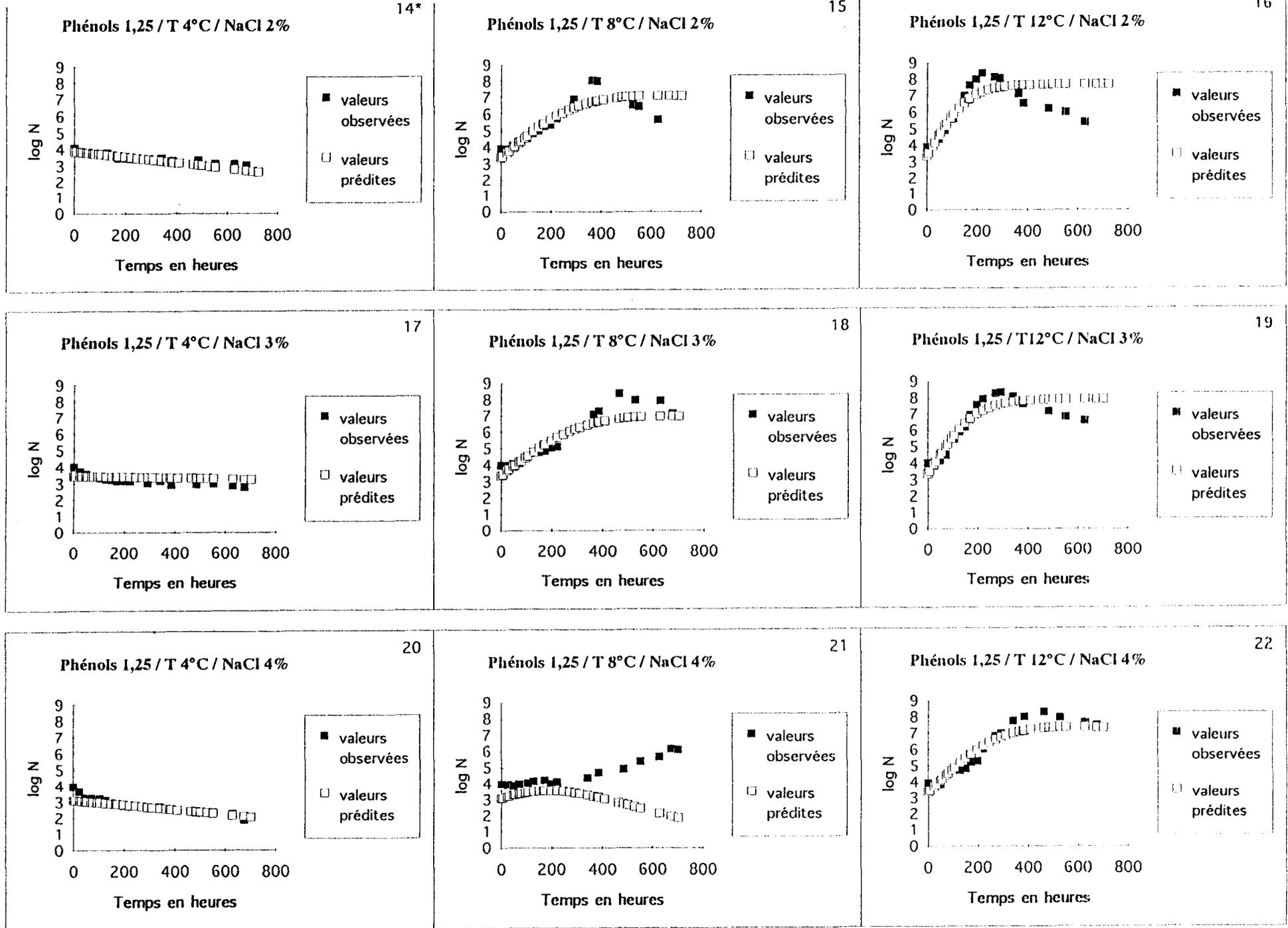


Fig 32 : Modèle continu : évolution de *Listeria* en fonction de la température et du taux de sel, à 1,25 mg de phénols / 100 ml. * : N° du traitement.

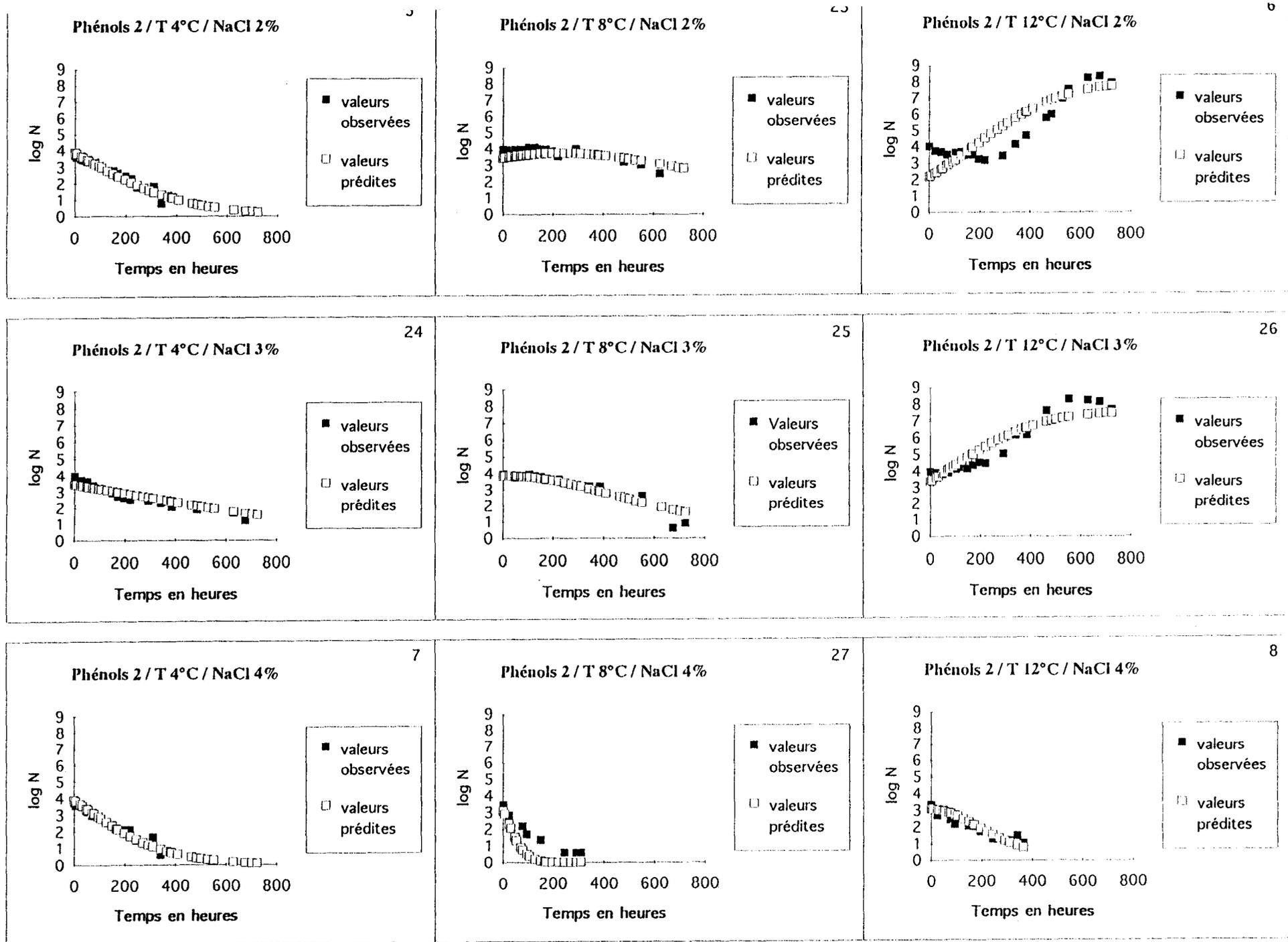
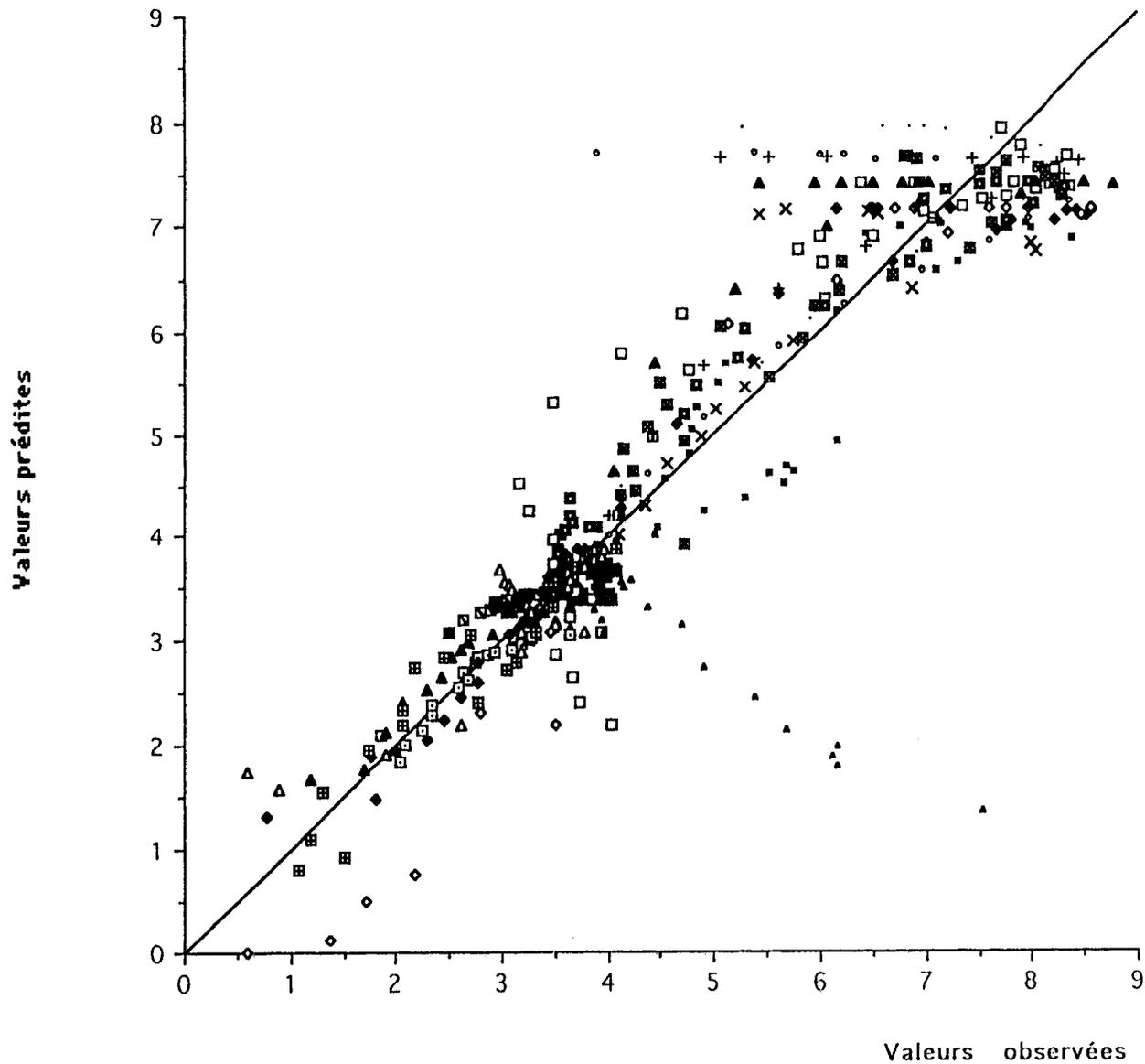


Fig 33 : Modèle continu : évolution de *Listeria* en fonction de la température et du taux de sel, à 2 mg de phénols / 100 ml. * : N° du traitement.

Fig 34 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu, du log de N de *Listeria*, en milieu LEB.



domaines d'expériences étudiés. De plus ce modèle ne faisant intervenir que 17 paramètres est plus simple au niveau utilisation

L'emploi de ce type de modèle basé sur l'étude de l'évolution de *Listeria* en milieu synthétique demande une validation sur produit (saumon fumé), afin de vérifier l'adéquation entre la réponse du modèle mathématique et la réponse obtenue sur saumon fumé.

III. 4. VALIDATION DU MODELE SUR SAUMON FUME : CHALLENGE - TESTS.

La réalisation de challenge - tests sur produits (saumon fumé) est le procédé le plus fiable pour vérifier la représentativité des prévisions du modèle "continu" sur le produit fini (NOTERMANS et IN'T VELD 1994).

III. 4. 1. Caractéristiques physico-chimiques des saumons fumés.

Pour mettre en oeuvre ces challenge - tests nous disposons de 6 échantillons de saumons fumés dont nous avons déterminé, à l'aide de deux dosages réalisés en double ; le taux de phénols et le taux de sel. Les caractéristiques de chaque échantillon et la température d'incubation déterminant la combinaison des facteurs étudiés sont rapportés Tableau XXXIV.

Les taux de sel obtenus pour les différents saumons fumés correspondent relativement bien aux taux de sel attendus (cf Matériel et méthodes). Par contre l'ajustement des taux de phénols semble plus délicat. En effet, le taux de 2 mg de phénol / 100 g n'a pu être atteint avec 4 H 30 de fumage. La plus forte valeur du taux de phénols enregistrée est de 1,12 mg / 100 g. L'intensité du fumage est dépendante de la qualité de la matière première (le taux de matière grasse, épaisseur des filets), mais dépend aussi du système de fumage (production et circulation de la fumée) (CUTTING et SPENCER 1968). Dans notre cas, la faible variation des taux de phénols obtenus pour 3H30 et 4H30 de fumage semble indiquer un phénomène de saturation au delà duquel la concentration en composés phénoliques n'augmente que très faiblement (CHAN *et al.* 1975).

III. 4. 2. Résultats des challenge-tests.

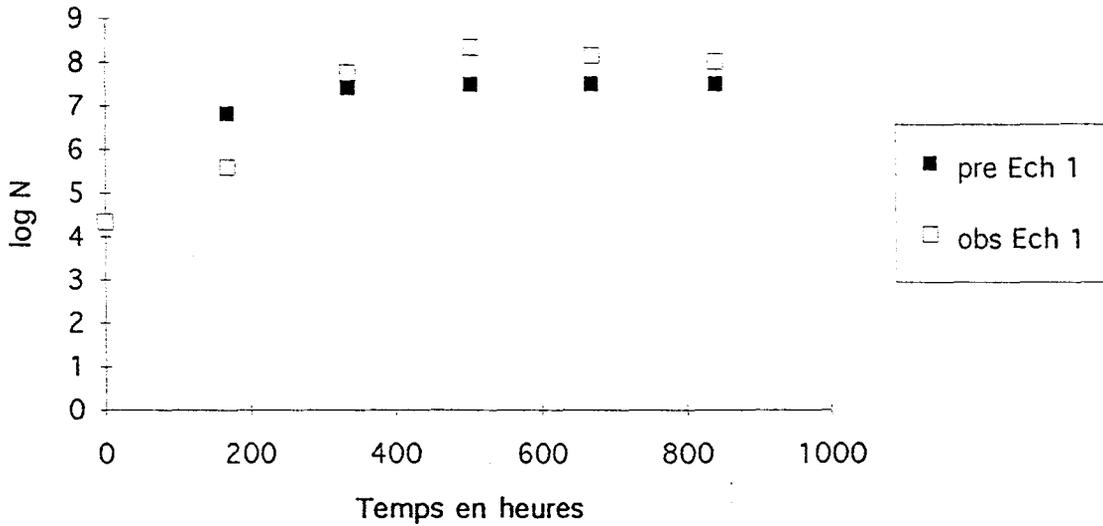
III. 4. 2. 1. Comportement de *Listeria* dans le saumon fumé.

Dans les échantillons stockés à 4°C (Fig 36, 38, 42, 44, 48, 50), *Listeria* ne présente pas de croissance jusqu'à 336 Heures. Au delà de ces 336 Heures, une légère croissance peut être observée dans les saumons inoculés avec un mélange de trois souches de *Listeria* (*L. innocua* 6b,

N° Echantillon	Taux de phénol en mg / 100 g		Taux de NaCl en %		Température d'incubation
	Dosage 1 Dosage 2	valeur moyenne ± 5%	Dosage 1 Dosage 2	Valeur moyenne ± 5%	
1	0,86	0,84 < 0,88 < 0,93	2,31	2,19 < 2,31 < 2,43	8
	0,87		2,32		
	0,87		2,32		
	0,93		2,32		
	1,10		2,88		
2	1,08	1,01 < 1,07 < 1,12	2,32	2,38 < 2,50 < 2,55	4
	1,02		2,32		
	1,02				
	1,08		2,9		
3	1,08	1,00 < 1,06 < 1,11	2,9	2,88 < 3,04 < 3,19	8
	1,04		3,19		
	1,14		2,9		
4	1,14	1,07 < 1,12 < 1,18	2,9	2,75 < 2,9 < 3,04	4
	1,10		2,9		
	1,13		2,9		
	0,94		4,05		
5	0,95	0,92 < 0,97 < 1,02	3,48	3,57 < 3,76 < 3,94	12
	1,039		3,48		
	1,14		4,05		
	1,07		3,48		
6	1,099	1,04 < 1,09 < 1,15	4,05	3,66 < 3,86 < 4,05	12
	1,08				

Tableau XXXIV : Caractéristiques physico-chimiques des différents saumons fumés utilisés pour les challenge-tests.

Fig 35 : Comparaison des valeurs du log N de Listeria monocytogenes 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % NaCl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 36 : Comparaison des valeurs du log N de Listeria monocytogenes 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % NaCl et stocké à 4°C

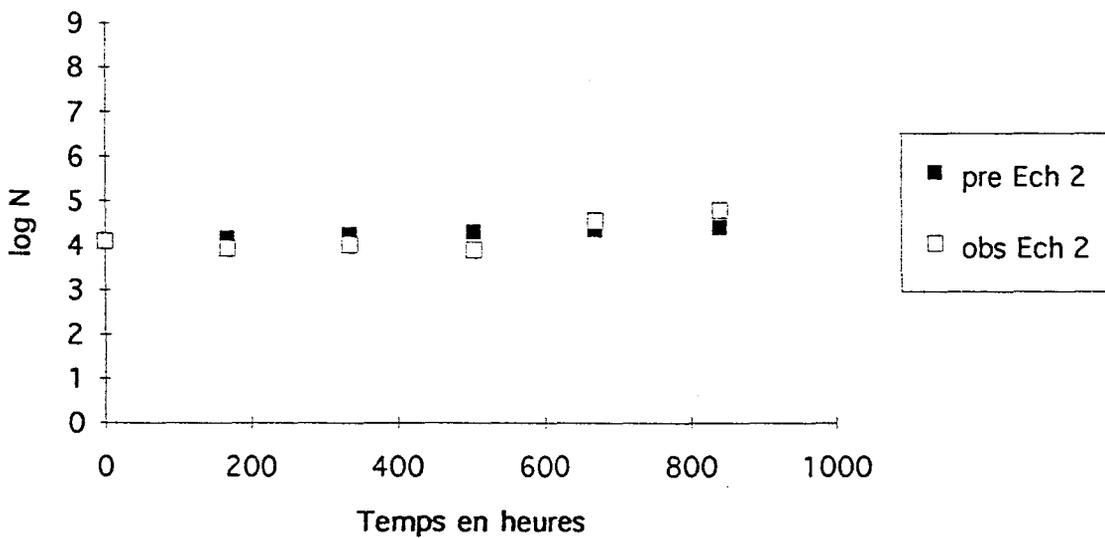
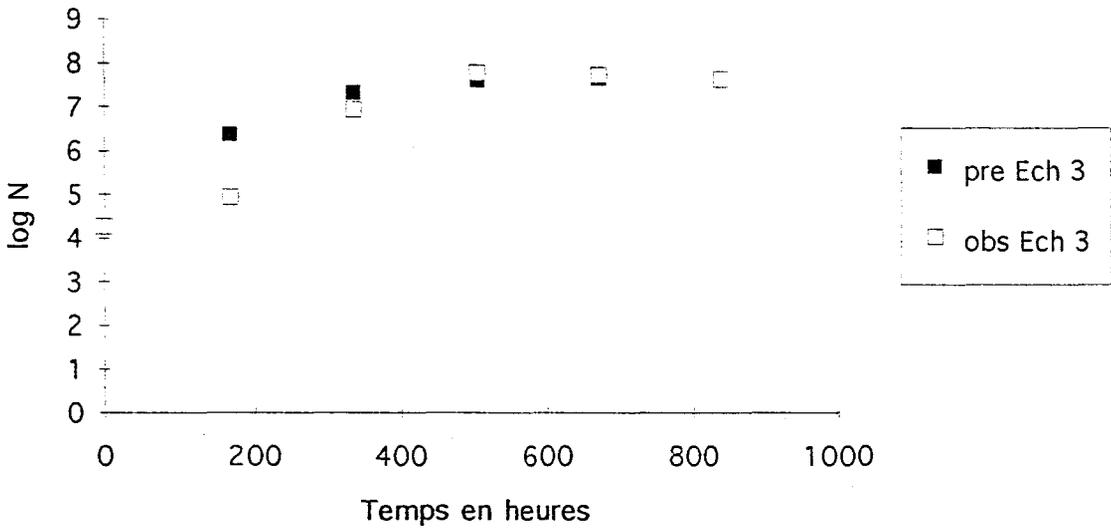


Fig 37 : Comparaison des valeurs du log N de Listeria monocytogenes 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % NaCl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 38 : Comparaison des valeurs du log N de Listeria monocytogenes 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9 % NaCl et stocké à 4°C

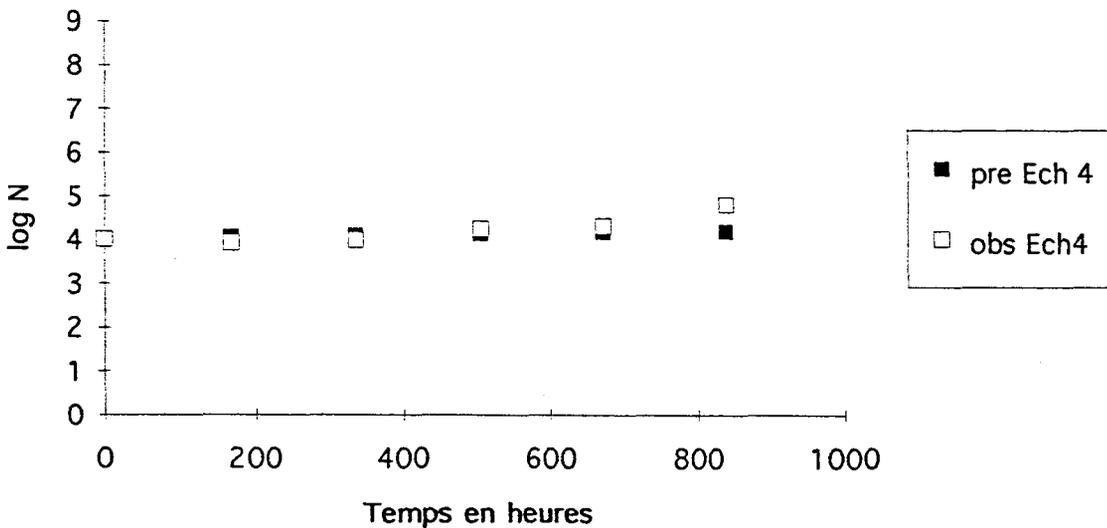
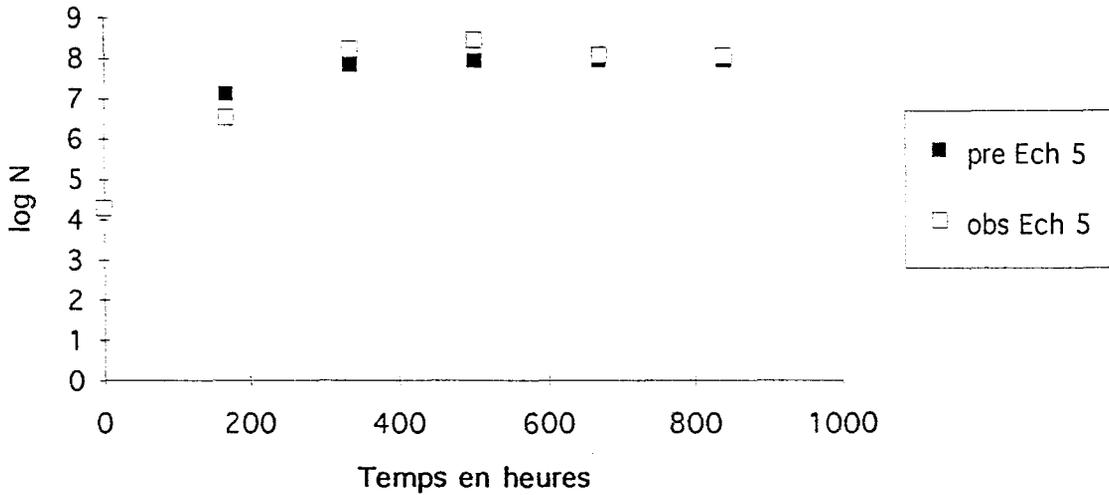


Fig 39 : Comparaison des valeurs du log N de *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % NaCl et stocké à 12°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 40 : Comparaison des valeurs du log N de *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 prédites et observées pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % NaCl et stocké à 12°C

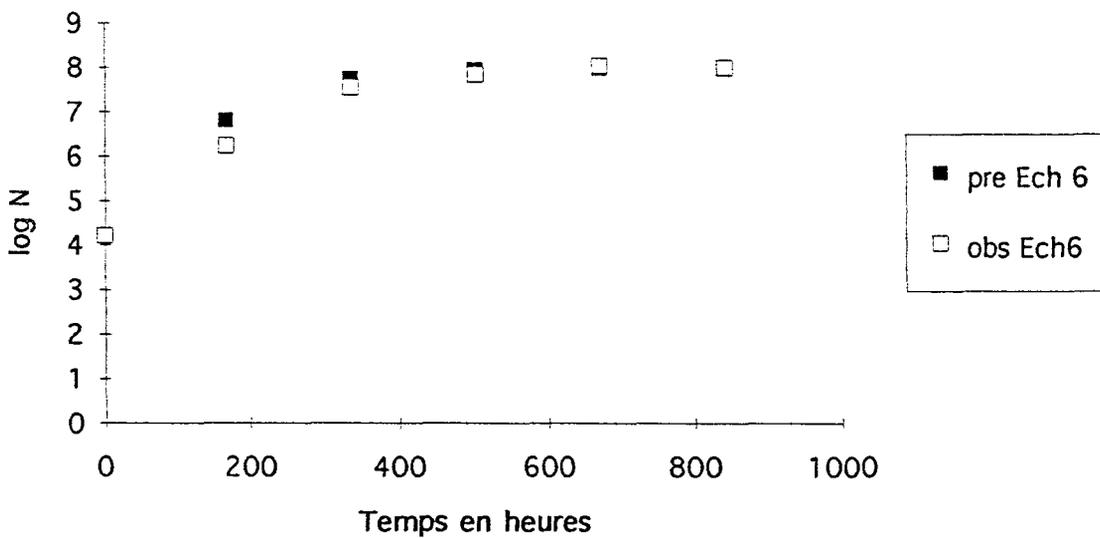
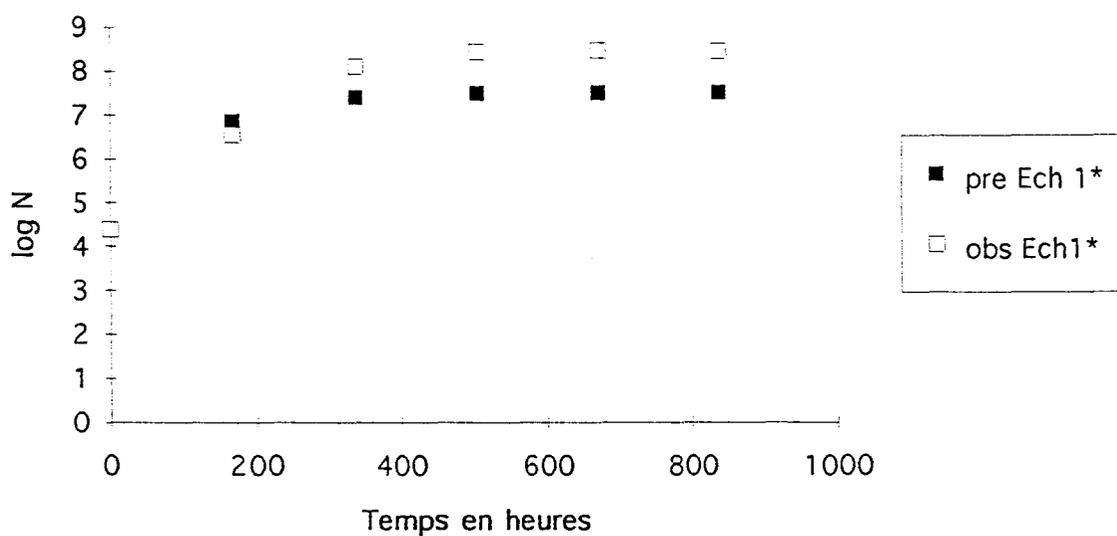


Fig 41 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % Nacl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 42 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % Nacl et stocké à 4°C

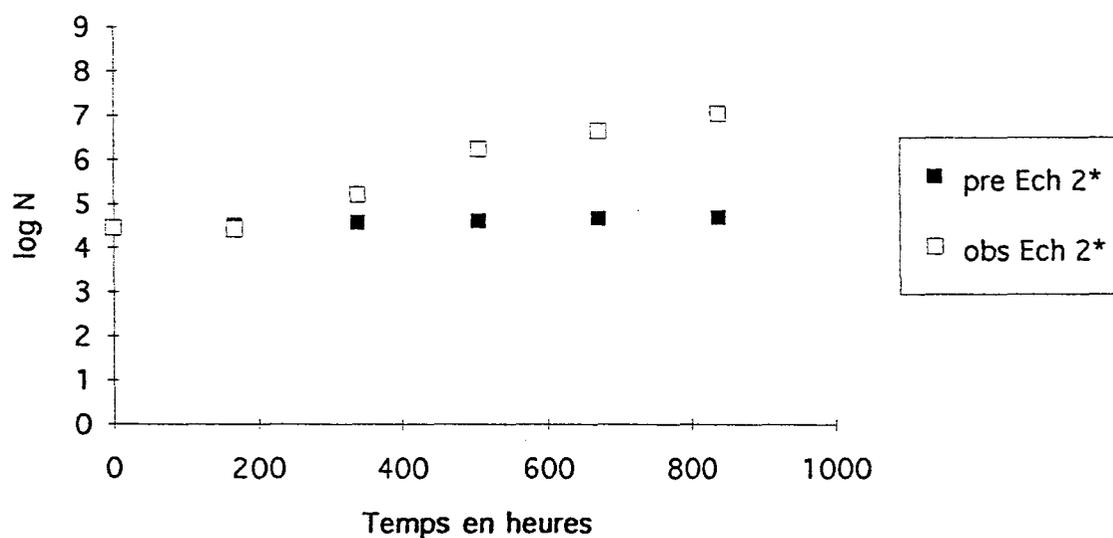
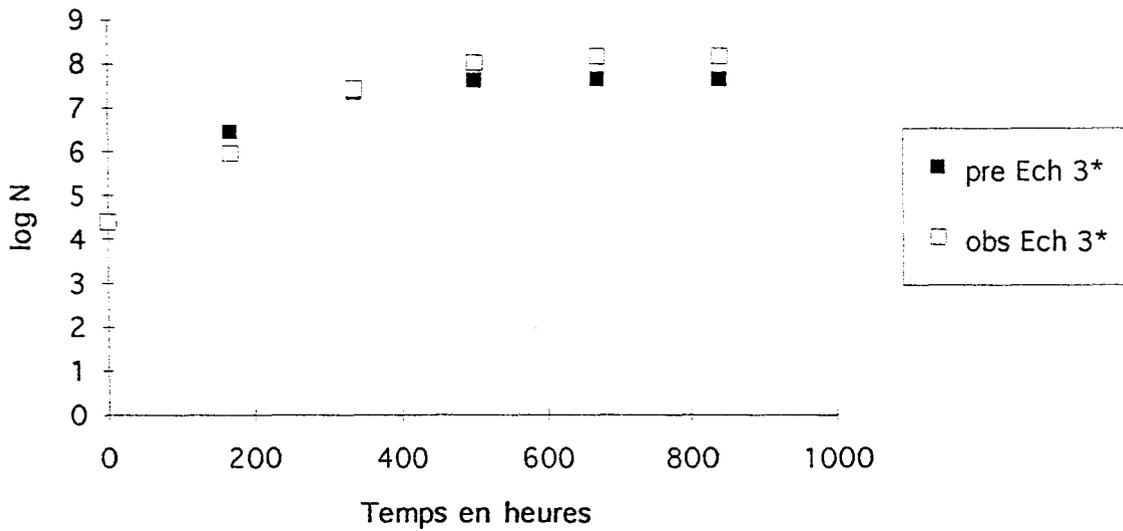


Fig 43 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % Nacl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 44 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9 % Nacl et stocké à 4°C

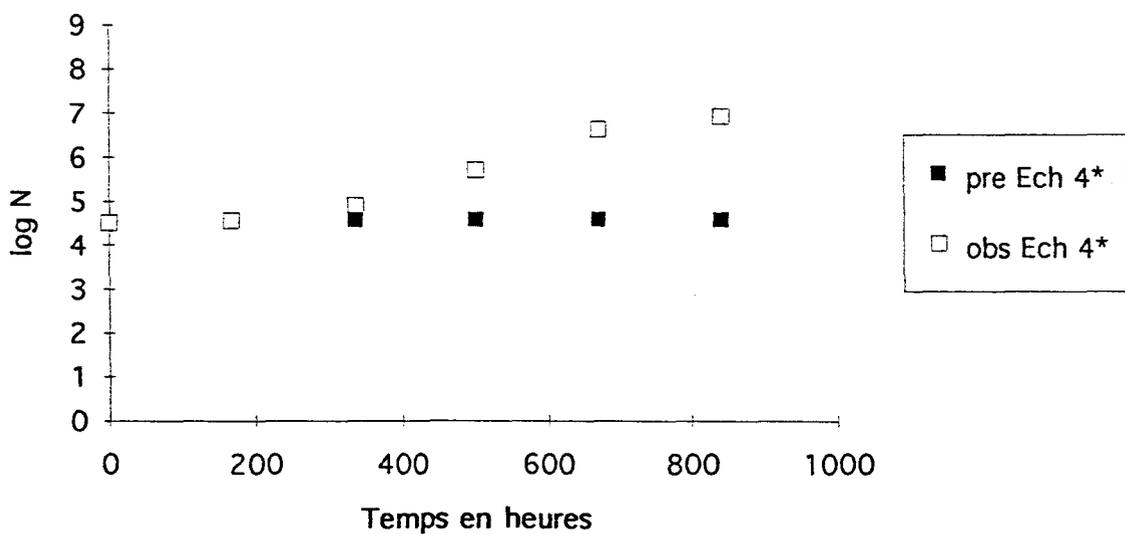
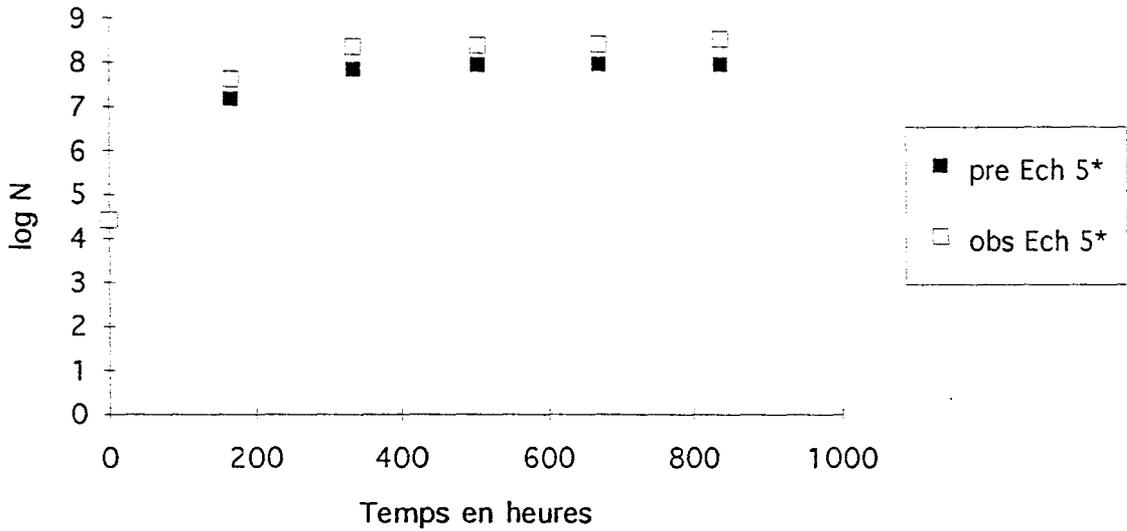


Fig 45 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de Listeria prédites et observées pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % Nacl et stocké à 12°C



Obs : Valeurs observées
 Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 46 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de Listeria prédites et observées pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % Nacl et stocké à 12°C

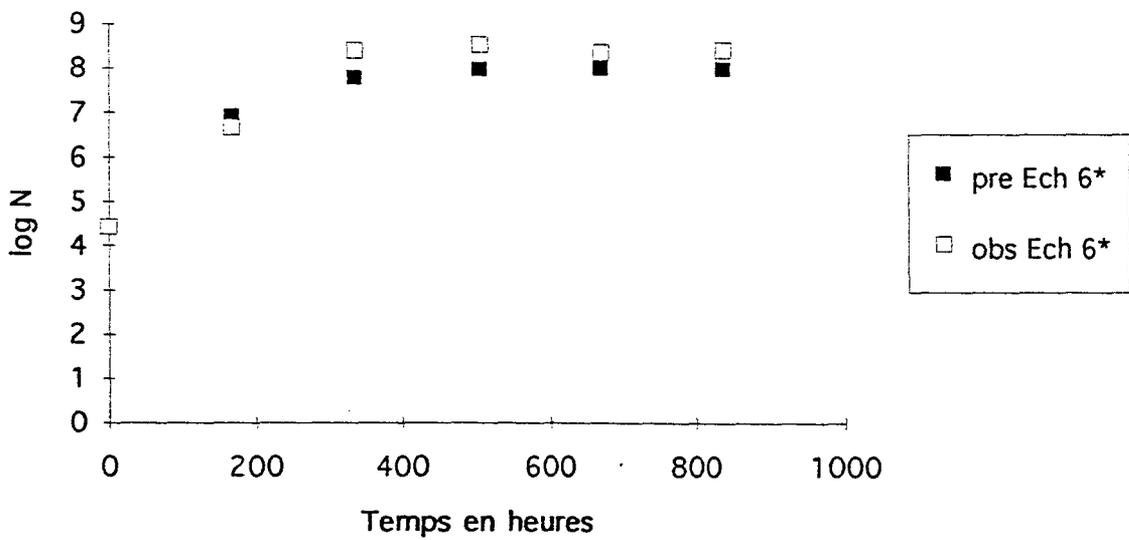
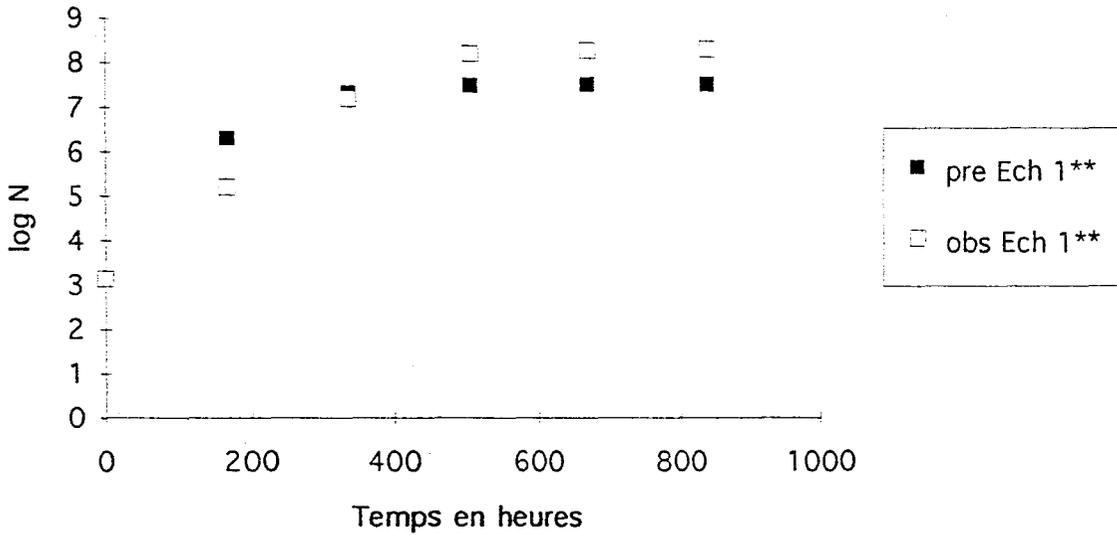


Fig 47 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 0,88 mg de phénols / 100g, 2,31 % NaCl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 48 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,07 mg de phénols / 100g, 2,5 % NaCl et stocké à 4°C

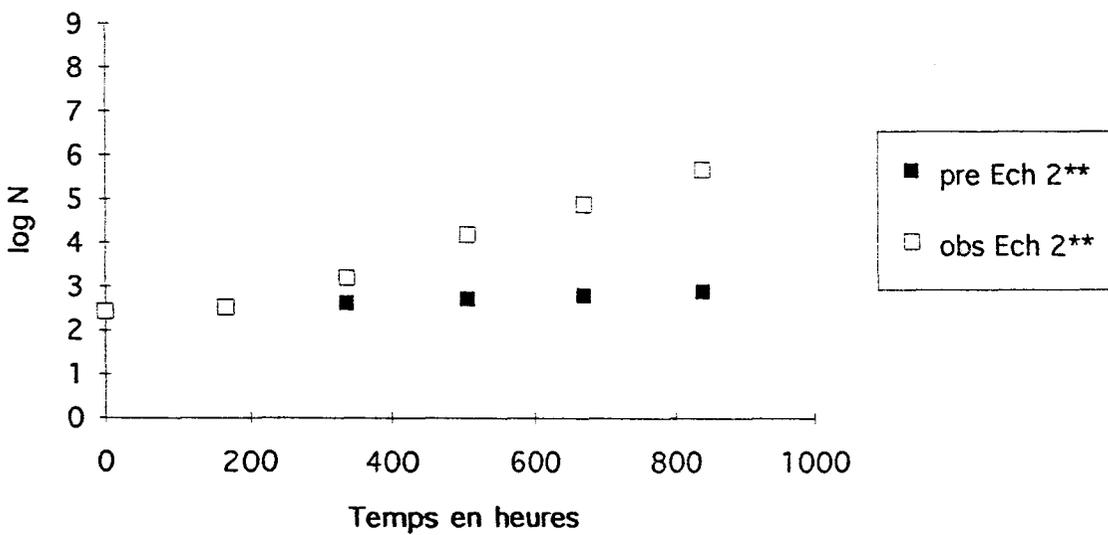
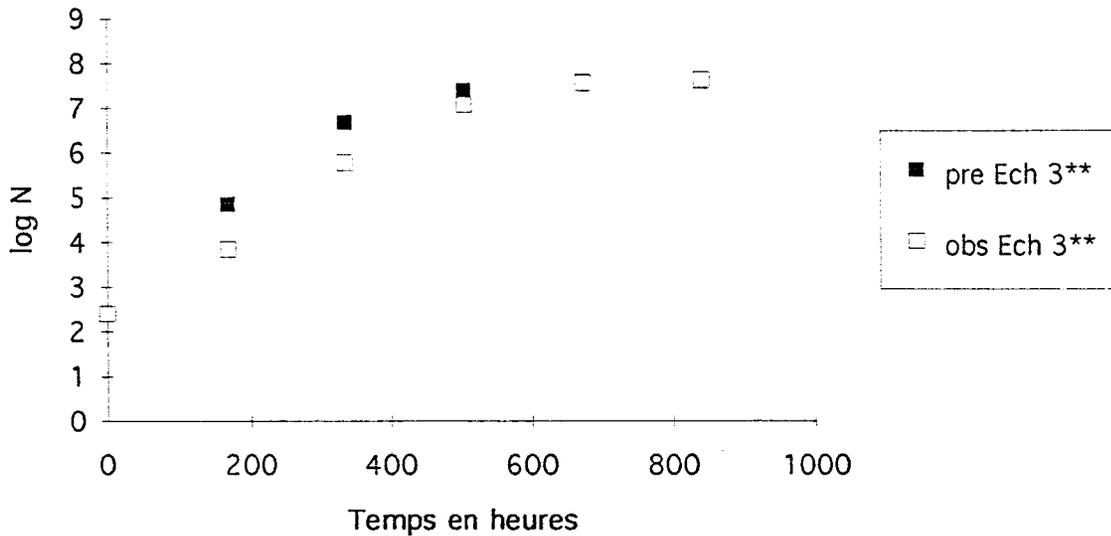


Fig 49 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,06 mg de phénols / 100g, 3,04 % NaCl et stocké à 8°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 50 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,12 mg de phénols / 100g, 2,9 % NaCl et stocké à 4°C

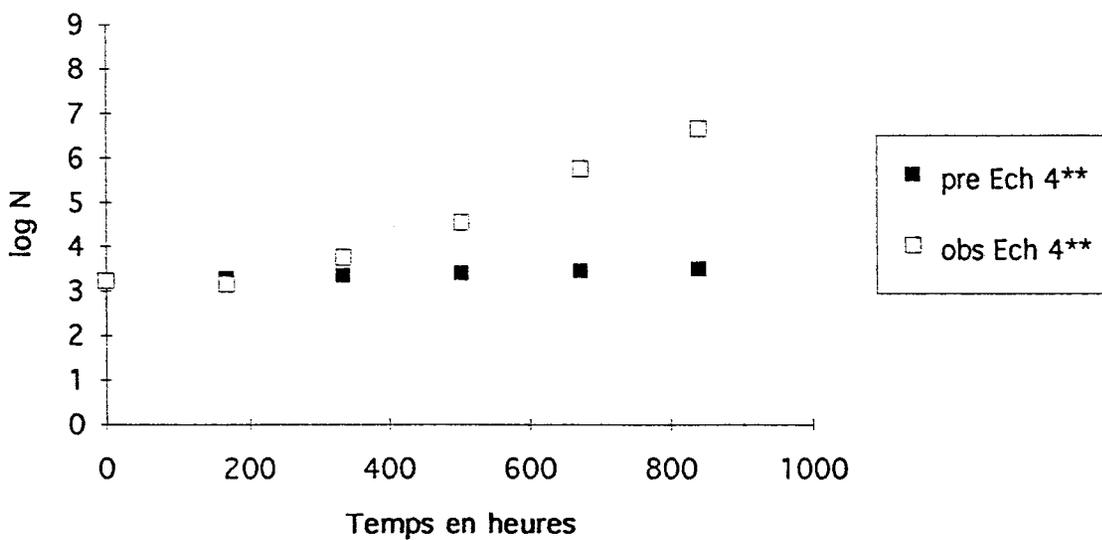
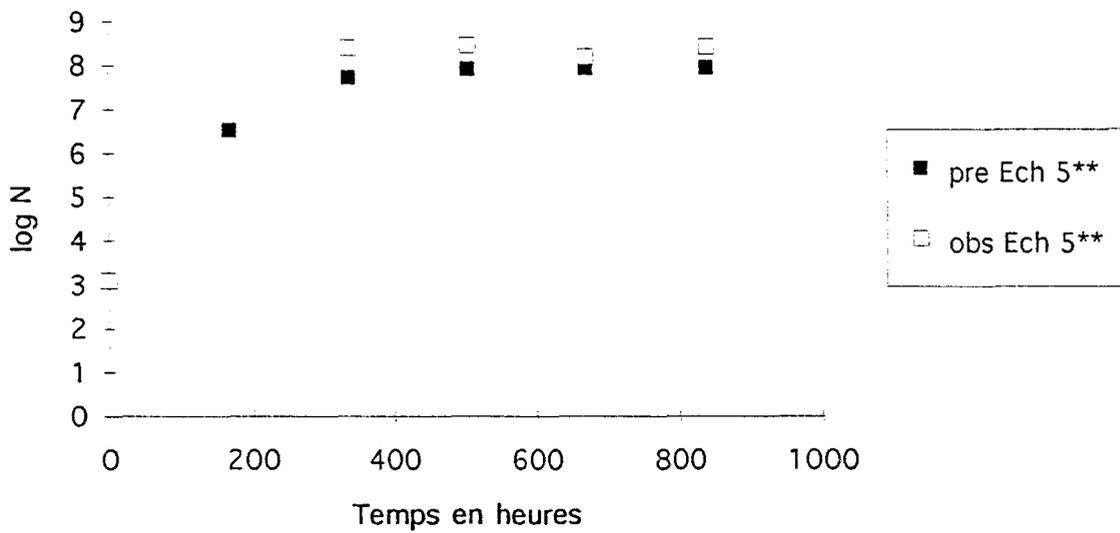


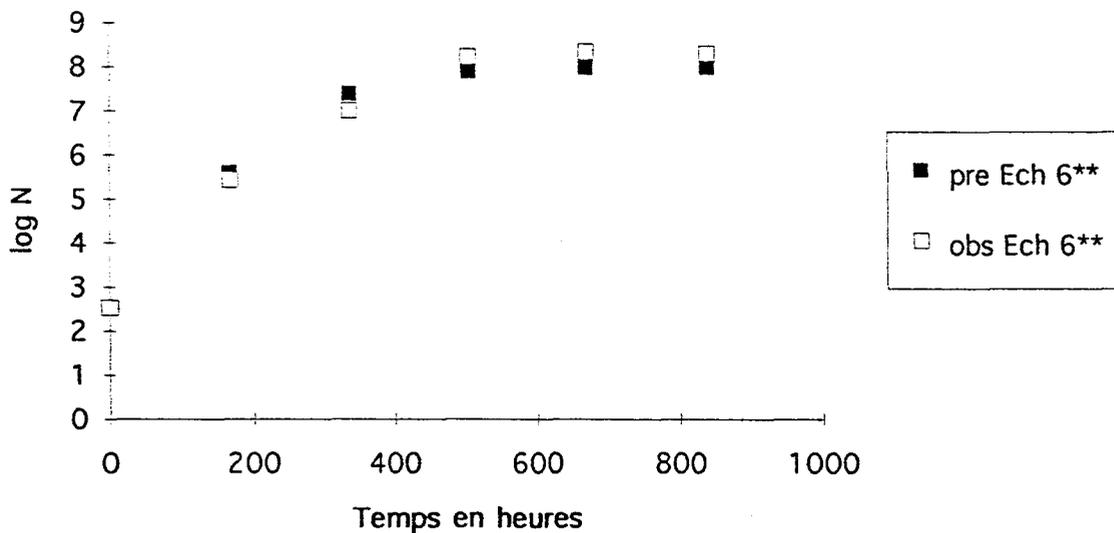
Fig 51 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 0,97 mg de phénols / 100g, 3,76 % Nacl et stocké à 12°C



Obs : Valeurs observées

Pre : Valeurs prédites par le modèle continu

Fig 52 : Comparaison des valeurs du log N d'un mélange de *Listeria* prédites et observées pour un saumon à 1,1 mg de phénols / 100g, 3,86 % Nacl et stocké à 12°C



L. monocytogenes 1/2b, *L. monocytogenes* isolée de saumon) ce qui n'est pas vérifié avec la souche *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115. L'effet souche décrit ici a été également décrit dans la bibliographie. En effet, RORVIK *et al.* (1991) mettent en évidence une augmentation de l'ordre de 1,5 log après 7 jours d'incubation à 4°C, aboutissant à une augmentation de la population *Listeria* de l'ordre de 4 log après 21 jours de stockage, d'un saumon fumé à 3% NaCl inoculé artificiellement à 2,7 log. Par contre, HUDSON (1993) montre que la population *Listeria* inoculée artificiellement avec un taux de 4,4 log, à un saumon à 3% NaCl, reste stable après 14 jours de stockage à 5°C et présente à 21 jours de stockage une augmentation de l'ordre de 3.3 log. Cette différence d'évolution relevée dans ces deux exemples de la bibliographie pourrait être expliquée par d'autres facteurs physico-chimiques liés aux saumons utilisés, comme le taux de phénols. Cependant, il faut noter que nous obtenons également une variation d'évolution de la population de *Listeria* pour un même échantillon de saumon, privilégiant ainsi l'effet souche.

A la température de 8 et 12°C de stockage des échantillon de saumons, (Fig 35, 37, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 49, 51, 52) nous observons une croissance de la population *Listeria* quelque soit la souche inoculée. Cette augmentation est après 7 jours de stockage de l'ordre de 0.6 à 2 unités log à 8°C et de 2 à 3 unités log à 12°C.

HUDSON (1993) mettent en évidence une évolution du même type pour une température intermédiaire de 10°C avec une augmentation de 3,4 unités log en 5 jours de stockage. Cette augmentation légèrement supérieure que celle relevée à 12°C dans nos échantillons peut être la résultante des facteurs physico-chimiques du saumon utilisé ou de la souche inoculée.

III. 4. 2. 2. Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle "continu" en fonction de la souche et du taux d'inoculation.

Les résultats du suivi de l'évolution de *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115, inoculée avec un taux de l'ordre de 10^4 bactéries / g, dans les différents saumons (Fig 35 à 40) présentent une bonne corrélation avec les prévisions données par le modèle "continu" pour les mêmes combinaisons des facteurs T°/ Phénol / NaCl.

En effet, la comparaison des valeurs observées et prédites couplée à la construction de la bissectrice (Fig 53) montre une répartition des points au voisinage de la bissectrice. 70 % des points sont répartis dans l'intervalle de $\pm 0,5$ log UFC /g, dont 23,3 % au dessus de la bissectrice (prédiction surestimée) et 46,6 % en dessous (prédiction sous estimée)(Tableau XXXXV). Si l'intervalle est augmenté à ± 1 unité log, alors 93% des points sont répartis dans ce nouvel intervalle, dont 30% correspondent à +1 log et 63,3% correspondent à - 1 log.

Les validations réalisées avec le mélange de trois *Listeria* pour un taux d'inoculation de l'ordre de 10^2 et 10^4 bactéries / g permettent d'obtenir une bonne corrélation avec les valeurs

Fig 53 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N de *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 inoculée, à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé

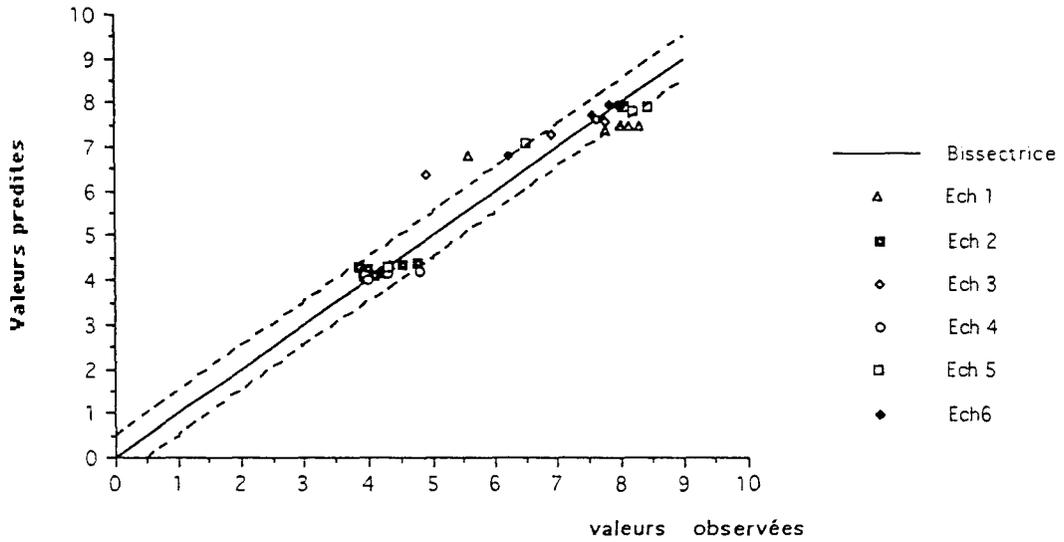


Fig 54 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N d'un mélange de *Listeria*, inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé.

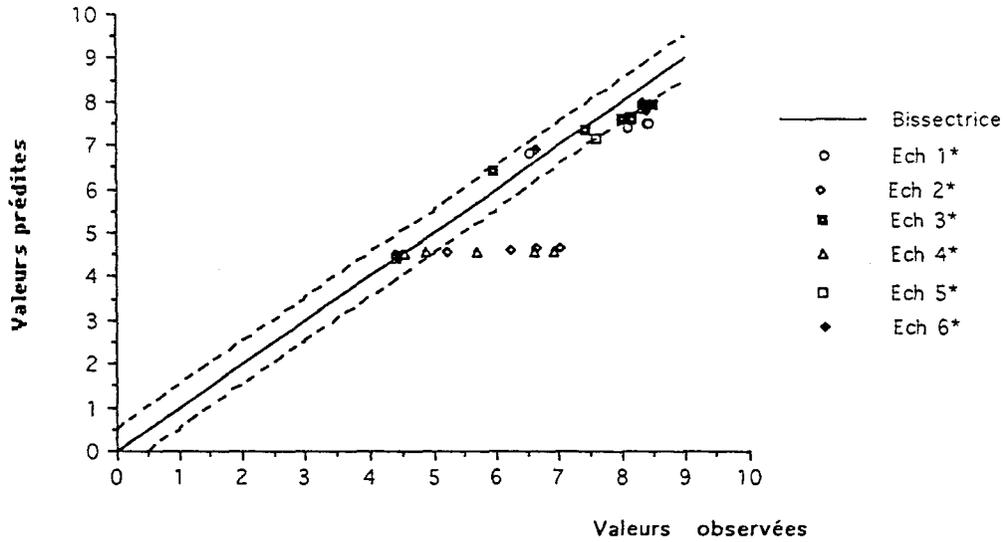
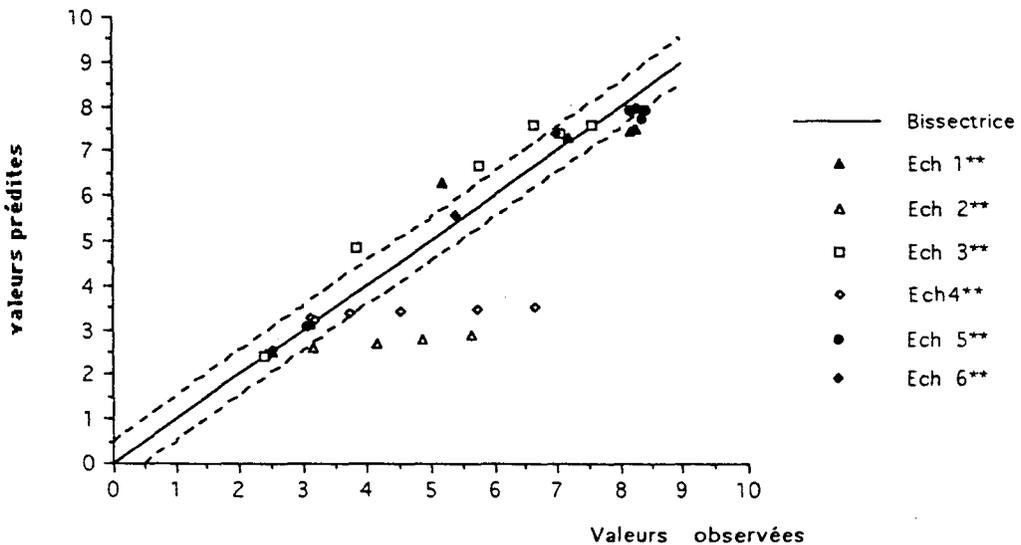


Fig 55 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N d'un mélange de *Listeria*, inoculé à un taux de l'ordre de 10^2 UFC / g de saumon fumé



Echantillons inoculés	Intervalle autour de la bissectrice de 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice de 1 unité log (%)		
	par	+ 0,5	- 0,5	±0,5	+ 1	- 1
<i>Lm</i> 4b ATCC 19115 à 10 ⁴ UFC / g	7/30 *	14/30	21/30	9/30	19/30	28/30
	(23,3)	(46,6)	(70)	(30)	(63,3)	(93)
Mélange de <i>Listeria</i> à 10 ⁴ UFC / g	4/30	9/30	13/30	4/30	20/30	24/30
	(13,3)	(30)	(43,3)	(13,3)	(66,6)	(80)
Mélange de <i>Listeria</i> à 10 ² UFC / g	8/29	8/29	16/29	9/29	13/29	22/29
	(27,5)	(27,5)	(55,1)	(31)	(44,8)	(75,8)
TOTAL	19/89	31/89	50/89	22/89	52/89	74/89
	(21,3)	(34,8)	(56,2)	(24,7)	(58,4)	(83,2)

Tableau XXXXV : Nombre d'échantillons présentant une variation, entre valeur observée et valeur prédite par le modèle "continu", inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction de la souche inoculée.

* le nombre d'observation ne tient pas compte des valeurs à Jo puisqu'elles sont fournies au modèle.

prédites pour les températures de 8 et 12°C. Par contre, les échantillons 2 et 4 présentent une variation significative entre les valeurs observées et prédites, après 14 Jours de stockage à 4°C (Fig 42, 44, 48, 50). Celle - ci est visualisée sur le graphe de la bissectrice par un ensemble de points ne suivant pas la direction de la bissectrice (Fig 54 et 55). Ce phénomène est observé pour un taux d'inoculation de l'ordre de 10^2 et 10^4 bactéries / g indiquant un effet souche et non un effet du taux d'inoculation.

Le pourcentage des points répartis dans un intervalle de $\pm 0,5$ unité log est de 43,3 % pour le mélange de *Listeria* inoculé à 10^4 bactéries / g et de 55 % pour le mélange inoculé à 10^2 bactéries /g (Tableau XXXXV).

Ce pourcentage devient respectivement 80 % et 75,8 % dans le cas d'un intervalle de ± 1 unité log. Comme pour l'inoculation de la souche *L. monocytogenes* 4b, les pourcentages des valeurs sous-estimées sont plus importants que ceux des valeurs surestimées.

La vérification de la prédiction sur saumon, à toutes les températures, avec la souche ayant servie à l'établissement du modèle confirme l'ajustement de celui - ci.

La modification du taux d'inoculation ne semble pas trop affecter la validité des prédictions sur saumon avec un pourcentage de 43,3 à 55 % des points répartis dans un intervalle de $\pm 0,5$ unité log et de 75 à 80 % pour un intervalle de ± 1 unité log.

Seul un effet souche a été mis en évidence avec l'inoculation d'un mélange de trois *Listeria*, pour une température d'incubation de 4°C. Une variation maximale de 1,7 unité log a été enregistrée à 21 jours et dans ce cas le modèle prédit une valeur du log N de *Listeria* inférieure à celle observée, mettant en défaut le modèle. Cet effet apparaissant après 14 jours de stockage permet néanmoins une utilisation du modèle mathématique qui prédit globalement 60% des valeurs dans un intervalle de $\pm 0,5$ unité log et 83 % des valeurs dans un intervalle de ± 1 unité log.

La non détection de cet effet à 8 et 12°C semble indiquer un comportement particulier du mélange de *Listeria* à 4°C. L'observation d'un début de croissance après 14 jours de stockage à 4° avec le mélange des trois souches témoigne d'un métabolisme plus adapté à 4°C que celui de la souche *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115 où aucune croissance n'est observée.

III. 4. 2. 3. Comparaison entre valeurs observées et prédites par le modèle "continu", en fonction du temps de stockage de l'échantillon.

La construction de la bissectrice entre valeurs observées et prédites en fonction du temps de stockage des échantillons de saumons, nous permet d'évaluer la fiabilité du modèle "continu" dans le cas d'une prédiction sur saumon fumé.

En effet, à 7 jours d'incubation, 64% des points sont situés dans un intervalle de $\pm 0,5$ unité log dont 60% représente une surestimation de la valeur prédite, avec une position sur la bissectrice ou légèrement au dessus (Fig 56). Ce pourcentage peut atteindre 76,5 % avec un intervalle de ± 1

Fig 56 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N de Listeria à 7 jours de stockage, sur saumon fumé.

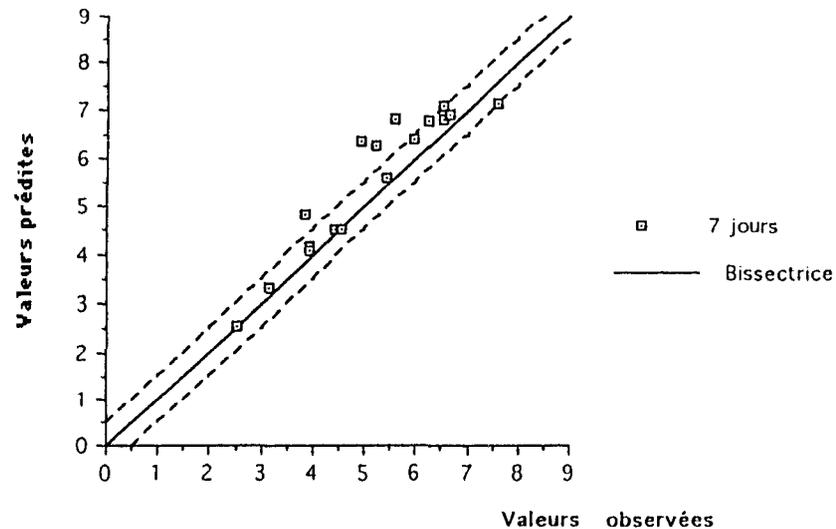


Fig 57 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N de Listeria à 14 jours de stockage, sur saumon fumé.

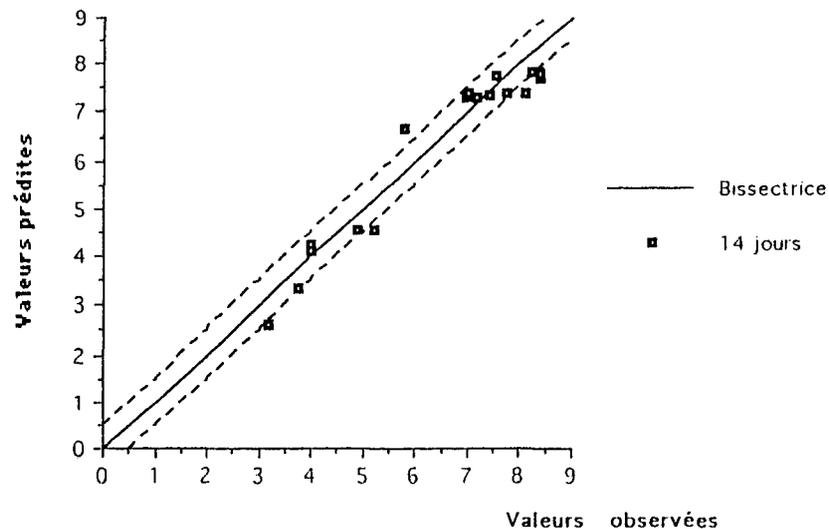


Fig 58 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N de Listeria à 21 jours de stockage, sur saumon fumé.

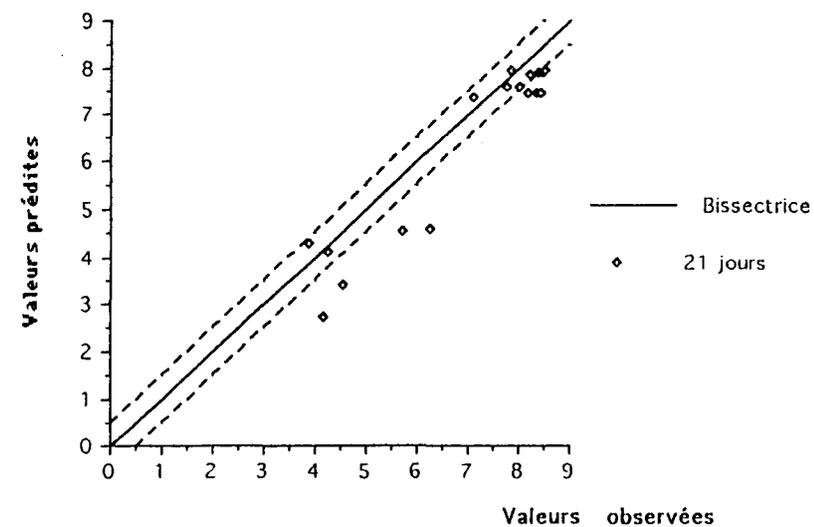
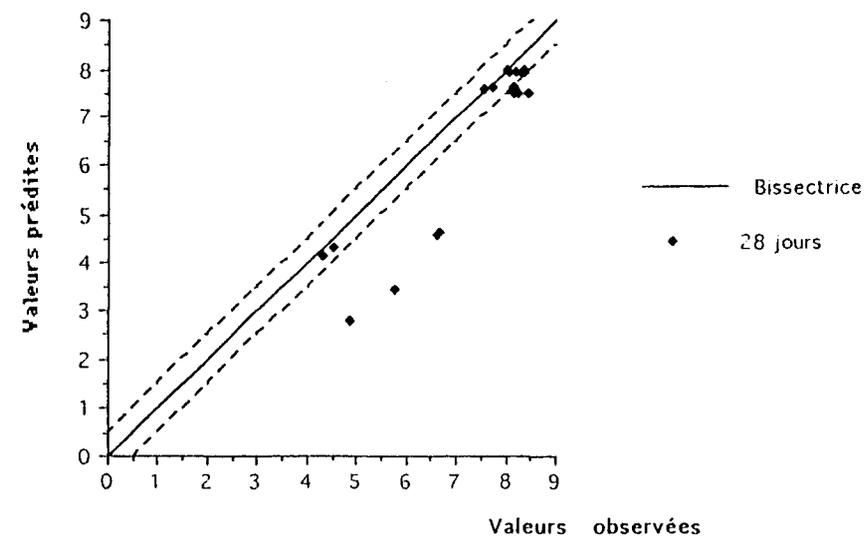


Fig 59 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le modèle continu du log N de Listeria à 28 jours de stockage, sur saumon fumé.



unité log, en corrélation avec une augmentation à 64,7 % le nombre des valeurs surestimées (Tableau XXXXVI).

A 14 jours de stockage, 66.6% des points sont compris dans l'intervalle de ± 0.5 unité log autour de la bissectrice pour s'élever à 100% avec un intervalle de ± 1 unité log. Cette augmentation s'accompagne malheureusement d'un doublement des valeurs prédites sous estimées rendant celles-ci majoritaires (Fig 57, Tableau XXXXVI).

A 21 jours de stockage, le nombre de valeurs prédites restant dans l'intervalle de ± 0.5 unité log représente encore 50%, mais avec 38,8 % de valeurs sous estimées contre 11% de valeurs surestimées. L'élargissement de l'intervalle autour de la bissectrice à ± 1 unité log implique un pourcentage moins élevé de 72% par rapport à celui de 14 Jours de stockage (Fig 58, Tableau XXXXVI).

Les prédictions pour 21 jours sont moins fiables sans être pour autant catastrophiques, par contre , les prédictions à 28 et 35 jours présentent trop de points éloignés de la bissectrice pour être exploitables dans le cas du saumon fumé (Fig 59).

La validité du modèle mathématique ayant été dans un premier temps vérifiée par rapport aux valeurs expérimentales sur milieux liquides puis confrontée aux valeurs sur saumon fumé, il apparait que celui - ci est utilisable jusqu'à 21 jours de stockage. Seule la température de 4°C peut être l'objet de dissensions où un effet de souche peut intervenir et entraîner des variations de 1 à 1,7 unité à log sur le résultat final.

III. 4. 2. 4. Challenge-tests sur saumons fumés et prévisions du Food Micromodel.

Actuellement, il existe des modèles mathématiques permettant de prédire le comportement de certains micro-organismes impliqués dans des infections d'origine alimentaire comme *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus*.

Aux USA, Le Microbial Food Safety Research Unit de l'USDA a mis au point un outil sous forme de surfaces de réponses appelé le "Pathogen modeling Program", pouvant prendre en compte le taux initial de bactéries, le pH, le taux de NaCl, la température, le taux de NaNO₂. Les informations peuvent être représentées par les paramètres cinétiques de croissance, le temps nécessaire pour atteindre une concentration en micro-organismes ou courbes de croissance (WHITING et BUCHANAN 1994, ROSS et Mc MEEKIN 1994).

Echantillons stockés	Intervalle autour de la bissectrice de 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice de 1 unité log (%)		
	+ 0,5	- 0,5	±0,5	+ 1	- 1	± 1
	7 Jours	9/17* (52,9)	2/17 (11,7)	11/17 (64,7)	11/17 (64,7)	2/17 (11,76)
14 Jours	6/18 (33,3)	6/18 (33,3)	12/18 (66,6)	7/18 (38,8)	11/18 (61,8)	18/18 (100)
21 Jours	2/18 (11,1)	7/18 (38,8)	9/18 (50)	2/18 (11,1)	13/18 (72,2)	15/18 (83,3)
28 Jours	1/18 (5,5)	9/18 (50)	10/18 (55,5)	1/18 (5,5)	13/18 (72,2)	14/18 (77,7)
35 Jours	1/18 (5,5)	7/18 (38,8)	8/18 (44,4)	1/18 (1,5)	13/18 (72,2)	14/18 (77,7)
TOTAL	19/89 (21,3)	31/89 (34,8)	50/89 (56,2)	22/89 (24,7)	52/89 (58,4)	74/89 (83,2)

Tableau XXXXVI : Nombre d'échantillons présentant une variation entre valeur observée et valeur prédite par le modèle "continu" inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction du temps de stockage.

* le nombre d'observation ne tient pas compte des valeurs à Jo puisqu'elles sont fournies au modèle.

Parallèlement en Europe dans le cadre du programme FLAIR (Food Linked Agricultural and Industrial Research) de nombreux travaux de collaboration ont été mis en place pour développer la microbiologie prévisionnelle.

En Grande Bretagne, le "Food Micromodel" a été développé par le MAFF (Ministry of Agriculture Fisheries and Food) pour les aliments de six groupes majeurs : produits carnés, poissons, végétaux, produits laitiers, ovoproduits, et produits de boulangerie (WHITING et BUCHANAN 1994, ROSS et Mc MEEKIN 1994).

Dans le "Food Micromodel", les facteurs pris en compte sont la température, le pH, l' a_w et la concentration en NaCl. Dans le cas de *L. monocytogenes*, le modèle peut intégrer le taux d'acide lactique ou les nitrites. Ce modèle peut être appliqué dans la catégorie des produits de la mer notamment le saumon frais ou fumé.

Par l'intermédiaire de la CITPPM qui possède une version du "Food micromodel", nous avons utilisé les données physico-chimiques de nos saumons pour prédire l'évolution du log N de *Listeria* au cours du stockage. Ce modèle ne tenant pas compte du taux de phénols les prédictions proposées nous permettront d'évaluer l'importance de ce facteur en microbiologie prévisionnelle. Pour cette étude, les taux de sel ont été réexprimés en fonction du pourcentage de sel aqueux (donnée utilisée par le "Food micromodel"), le pH a été fixé à 6,2, et le modèle acide lactique ayant été choisi, le taux d'acide lactique a été fixé à zéro.

La construction des bissectrices entre valeurs observées et prédites par le "Food micromodel", pour les échantillons inoculés avec la souche *L. monocytogenes* 4b ATCC 19115 (Fig 60), le mélange des trois *Listeria* avec un taux d'inoculation à 10^2 (Fig 61) ou à 10^4 bactéries /g (Fig 62), montre dans l'ensemble des prévisions surestimées. En effet, dans les trois cas, la majorité des points se trouve au dessus de la bissectrice et généralement en dehors de l'intervalle de $\pm 0,5$ unité log où seulement 22,2 % des valeurs prédites sont représentées (Tableau XXXXVII). Ce pourcentage peut s'élever à 56,6 % en augmentant l'intervalle de ± 1 unité log, mais il reste inférieur au 60% des points prédits par le modèle continu pour un intervalle de $\pm 0,5$ unité log, dont la décomposition en valeurs sur estimées et sous estimées représente respectivement : 32% et 26,4%.

La comparaison des valeurs prédites et observées en fonction du temps de stockage de l'échantillon, montre que les estimations du "Food micromodel" sont surestimées. Elles sont situées à 53 % dans un intervalle de $\pm 0,5$ log autour de la bissectrice pour 7 jours de stockage. Au delà de 7 jours de stockage, ce pourcentage chute à 5,5 (14 jours) et 11,1 (21 jours), montrant le manque de réalisme de ces prévisions (Tableau XXXXVIII).

L'importance du pourcentage des valeurs sous estimées montre que le modèle "continu" ne présente pas encore toutes les caractéristiques requises pour être digne d'un modèle de

Fig 60 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le "Food micromodel" du log N de *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115, inoculée à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé

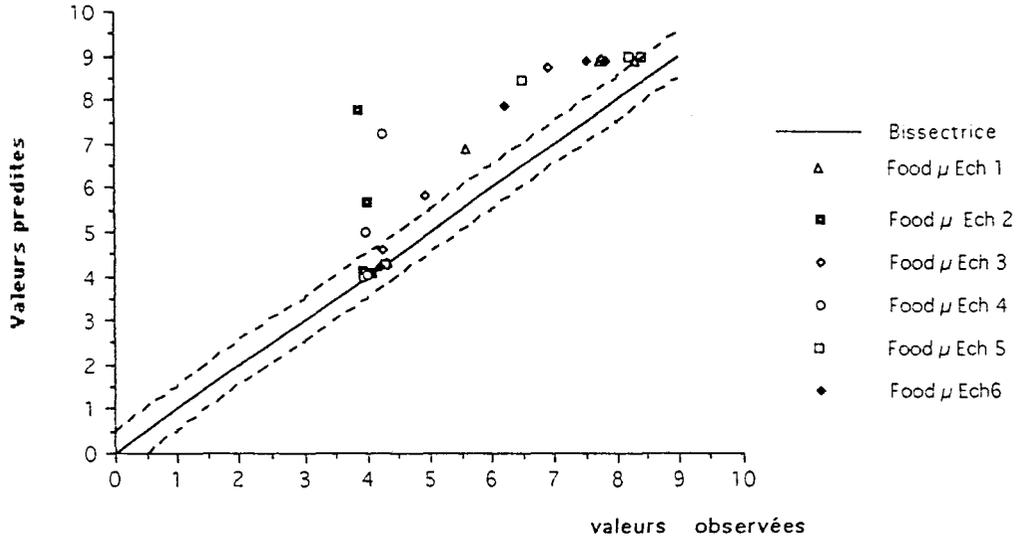


Fig 61 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le "Food micromodel" du log N d'un mélange de *Listeria*, inoculé à un taux de l'ordre de 10^4 UFC / g de saumon fumé.

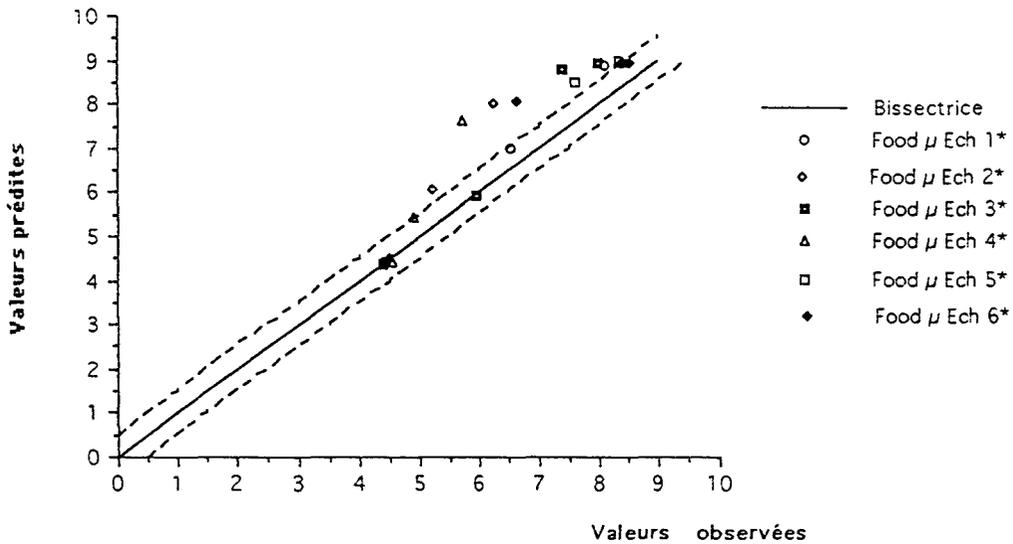
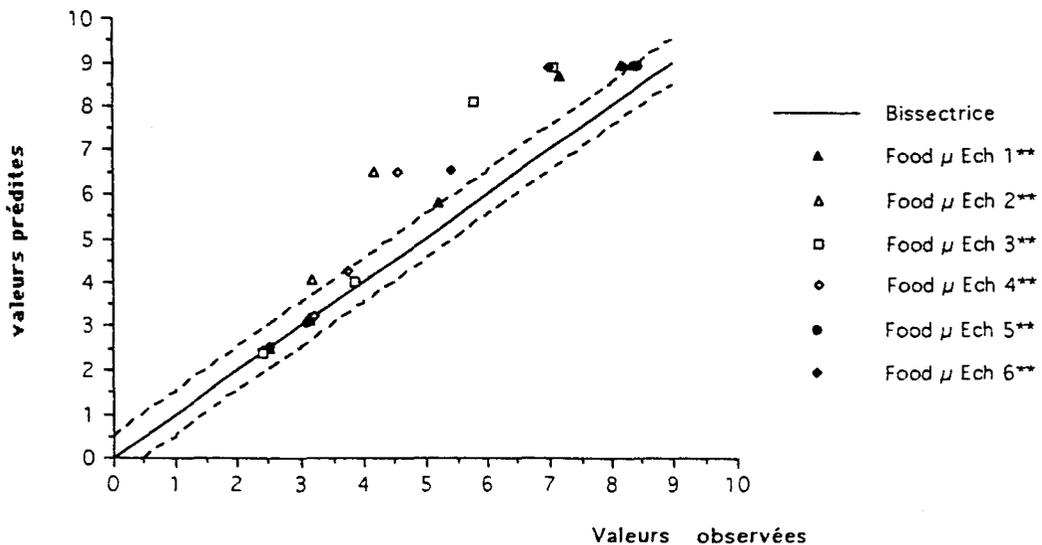


Fig 62 : Comparaison des valeurs observées et prédites par le "Food micromodel" du log N d'un mélange de *Listeria*, inoculé à un taux de 10^2 UFC / g de saumon fumé



Echantillons inoculés par	Modèle "continu"						"Food micromodel"					
	Intervalle autour de la bissectrice à 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 1 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 1 unité log (%)		
	+0,5	-0,5	±0,5	+1	-1	±1	+0,5	-0,5	±0,5	+1	-1	±1
<i>Lm</i> 4b ATCC 19115 à 10 ⁴ UFC / g	6/18* (33,3)	6/18 (33,3)	12/18 (66,6)	8,1/18 (44,4)	8/18 (44,4)	16/18 (88,8)	2/18 (11,1)	0/18 (0)	2/18 (11,1)	6/18 (33,3)	0/18 (0)	6/18 (33,3)
Mélange de <i>Listeria</i> à 10 ⁴ UFC/ g	4/18 (22,2)	6/18 (27,7)	10/18 (50)	4/18 (22,2)	12/18 (66,6)	16/18 (88,8)	3/18 (16,6)	2/18 (11,1)	5/18 (27,7)	12/18 (66,6)	2/18 (11,1)	14/18 (77,7)
Mélange de <i>Listeria</i> à 10 ² UFC / g	7/17 (41,1)	3/17 (17,6)	10/17 (58,8)	8/17 (47)	6/17 (35,2)	14/17 (82,3)	4/17 (23,5)	1/17 (5,8)	5/17 (29,4)	9/17 (52,9)	1/17 (5,8)	10/17 (58,82)
TOTAL	17/53 (32)	15/53 (26,4)	32/53 (60,3)	20/53 (37,7)	26/53 (49)	46/53 (86,7)	9/53 (16,9)	3/53 (5,66)	12/53 (22,2)	27/53 (50,9)	3/53 (5,6)	30/53 (56,6)

Tableau XXXXVII : Nombre d'échantillons présentant une variation entre valeur observée et valeur prédite inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction de la souche inoculée et le modèle de prédiction.

* le nombre d'observation prend en compte les valeurs jusqu'à 21 jours de stockage mais pas les valeurs à J0 puisqu'elles sont fournies au modèle.

Echantillons stockés	Modèle "continu"						"Food micromodel"					
	Intervalle autour de la bissectrice à 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 1 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 0,5 unité log (%)			Intervalle autour de la bissectrice à 1 unité log (%)		
	+0,5	-0,5	±0,5	+1	-1	±1	+0,5	-0,5	±0,5	+1	-1	±1
7 jours	9/17* (52,9)	2/17 (11,7)	11/17 (64,7)	11/17 (64,7)	2/17 (11,76)	13/17 (76,4)	6/17 (35,2)	3/17 (17,6)	9/17 (52,9)	9/17 (52,9)	3/17 (17,6)	12/17 (70,5)
14 Jours	6/18 (33,3)	6/18 (33,3)	12/18 (66,6)	7/18 (38,8)	11/18 (61,8)	18/118 (100)	1/18 (5,5)	0/18 (0)	1/18 (5,5)	9/18 (50)	0/18 (0)	9/18 (50)
21 Jours	2/18 (11,1)	7/18 (38,8)	9/18 (50)	2/18 (11,1)	13/18 (72,2)	15/18 (83,3)	2/18 (11,1)	0/18 (0)	2/18 (11,1)	9/18 (50)	0/18 (0)	9/18 (50)
TOTAL	17/53 (32)	15/53 (26,4)	32/53 (60,3)	20/53 (37,7)	26/53 (49)	46/53 (86,7)	9/53 (16,9)	3/53 (5,66)	12/53 (22,2)	27/53 (50,9)	3/53 (5,6)	30/53 (56,6)

Tableau XXXXVIII : Nombre d'échantillons présentant une variation entre valeur observée et valeur prédite inférieure à 0,5 et 1 unité log, en fonction du temps de stockage et le modèle de prédiction.

* le nombre d'observation prend en compte les valeurs jusqu'à 21 jours de stockage mais pas les valeurs à Jo puisqu'elles sont fournies au modèle.

microbiologie prévisionnelle, mais démontre que la prise en compte d'un facteur comme le taux de phénols est essentielle pour se rapprocher de la réalité du développement de *Listeria* dans le saumon fumé.

Ce modèle préliminaire établi avec un plan d'expériences réalisé avec une seule souche de *L. monocytogenes* devrait être considérablement amélioré par l'utilisation d'autres souches de *Listeria*, cela afin d'être plus représentatif de la variabilité des souches rencontrées dans le saumon et mise en évidence au cours de nos challenge-tests.

III. 5. MICROBIOLOGIE PREVISIONNELLE DE *LISTERIA* DANS LE SAUMON FUME : OUTILS GRAPHIQUES.

III. 5. 1. Evaluation de l'évolution de *Listeria* en fonction des différents facteurs.

D'un point de vue pratique, la façon dont a été construit le modèle "continu" permet une modélisation de la courbe d'évolution de *Listeria*, en fonction des facteurs étudiés compris dans les domaines de définition déterminés pour l'expérimentation.

Il est possible de visualiser aisément l'évolution de *Listeria* sur un graphe en trois dimensions La première dimension est utilisée pour l'intensité de la réponse ($\log N$), la deuxième dimension est représentative du temps de stockage de l'échantillon et la troisième fait intervenir les différentes valeurs d'un des facteurs étudiés, les deux autres facteurs étant fixes .

Ainsi neuf graphes sont obtenus en fonction d'un facteur (température ou taux de sel ou taux de phénols) pour prédire l'évolution de *Listeria*. Le taux d'inoculation choisi dans ce cas est de l'ordre de 4 unités log, mais la validation sur saumon avec un taux plus faible a montré peu de variation entre valeurs prédites et observées, si bien que d'autres taux peuvent être envisagés.

Par la détermination de trois caractéristiques du saumon fumé considéré : le taux de sel, le taux de phénols et la température de stockage, il est possible de déterminer l'évolution de la population *Listeria* à savoir croissance ou décroissance et de connaître le risque potentiel d'un lot de saumons fumés vis à vis de *Listeria*. (Fig 63 à 89).

III. 5. 2. Evaluation de l'évolution de *Listeria* au cours d'un stockage faisant varier le couple de paramètres temps / température.

Les représentations graphiques présentées précédemment ont un intérêt très limité concernant la durée de vie du produit saumon fumé. Par contre à l'aide d'un logiciel graphique et de la modélisation par le modèle "continu", il est possible d'accéder à une vision globale de l'évolution de *Listeria* dans un saumon ayant subi un stockage à différents couples temps /température.

Fig 63 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 2% NaCl et 0,5 mg de phénols

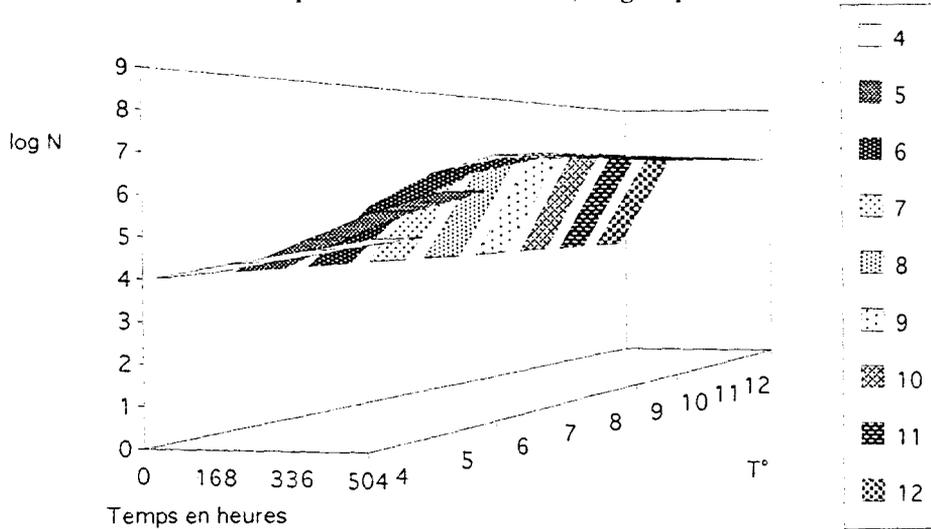


Fig 64 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 2% NaCl et 1,25 mg de phénols

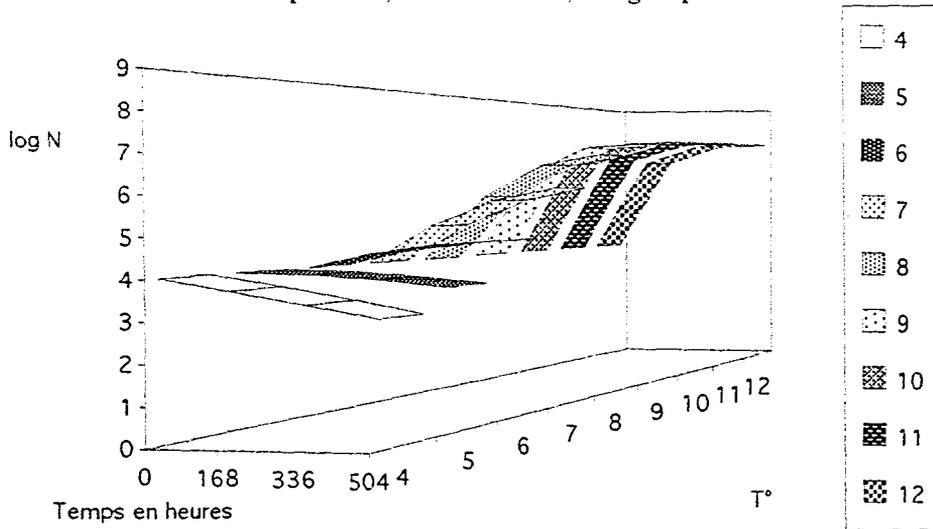


Fig 65 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 2% NaCl et 2 mg de phénols

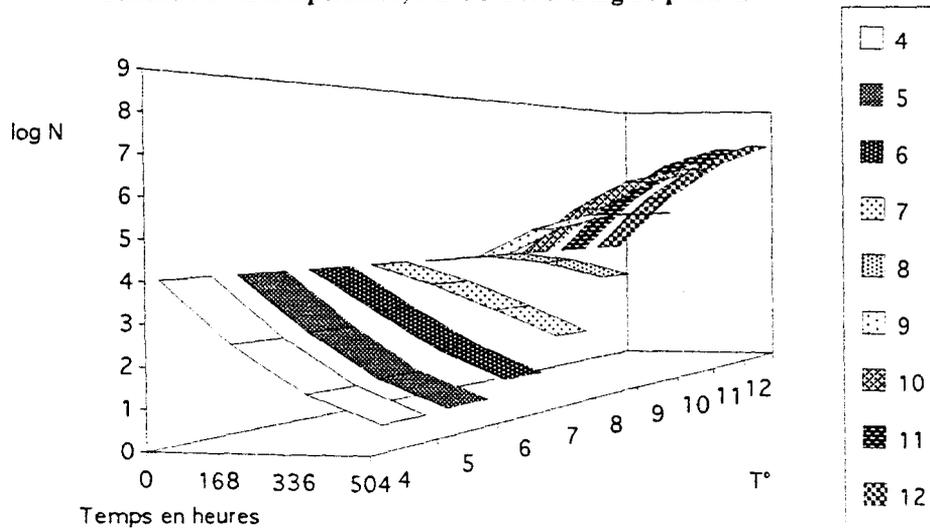


Fig 66 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 3% NaCl et 0,5 mg de phénols

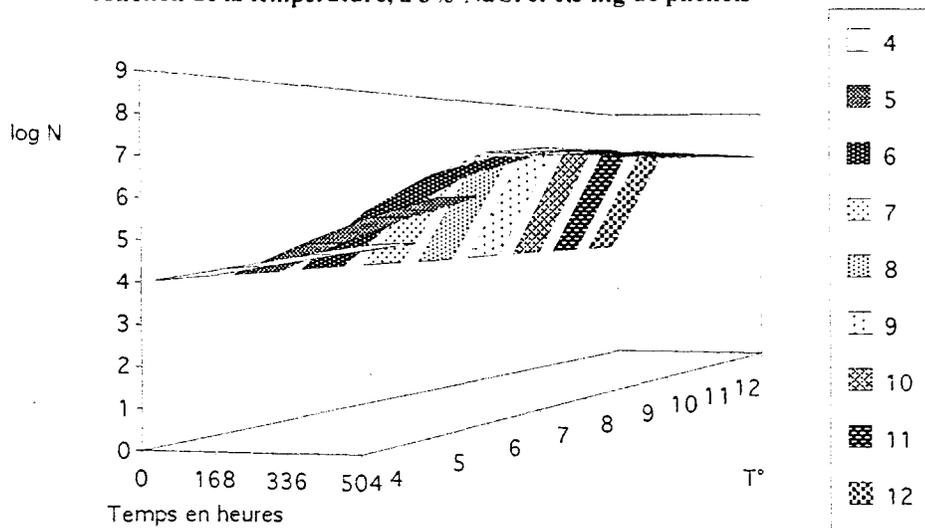


Fig 67 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 3% NaCl et 1,25 mg de phénols

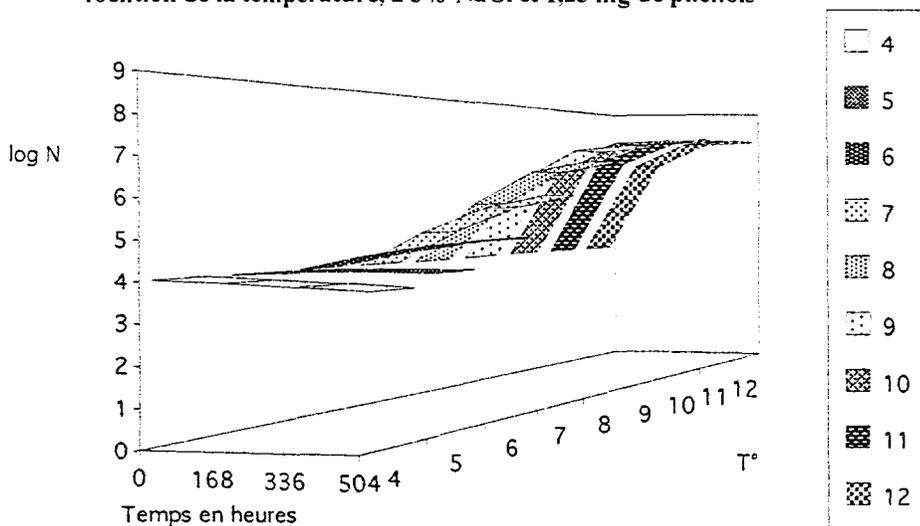


Fig 68 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 3% NaCl et 2 mg de phénols

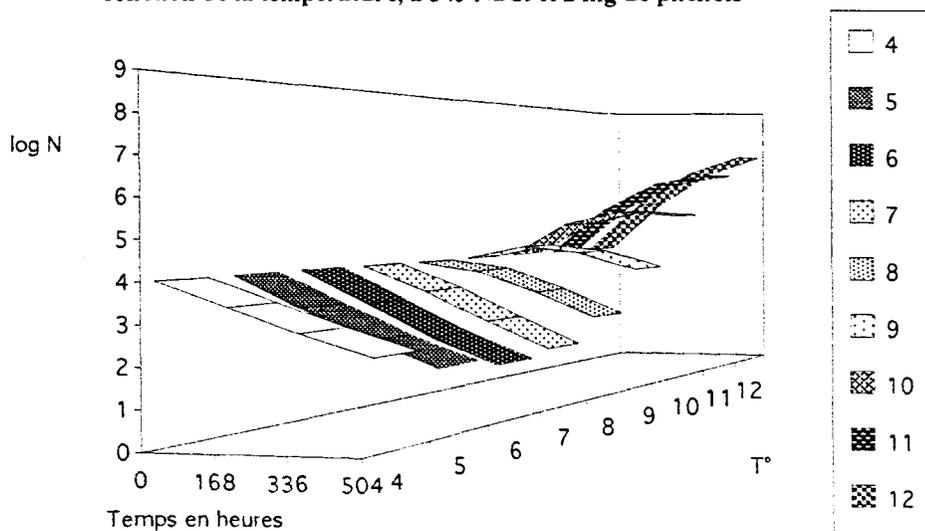


Fig 69 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 4% NaCl et 0,5 mg de phénols

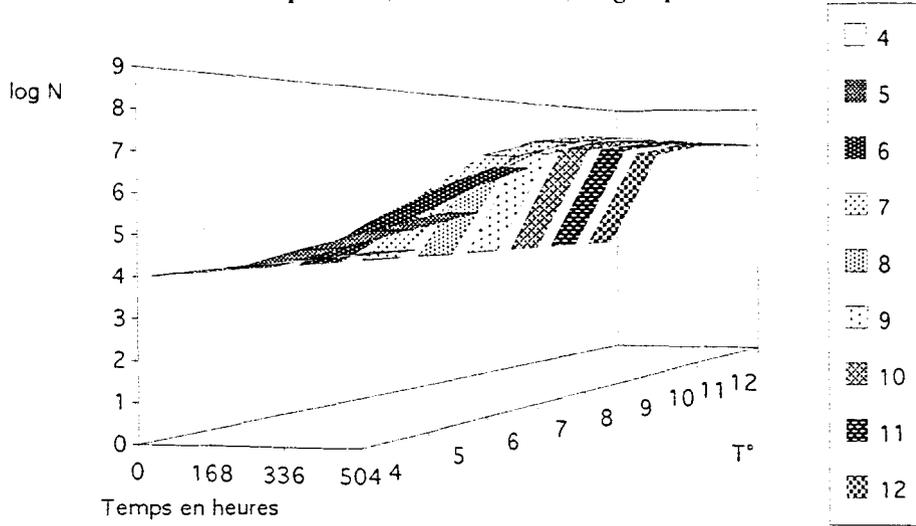


Fig 70 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 4% NaCl et 1,25 mg de phénols

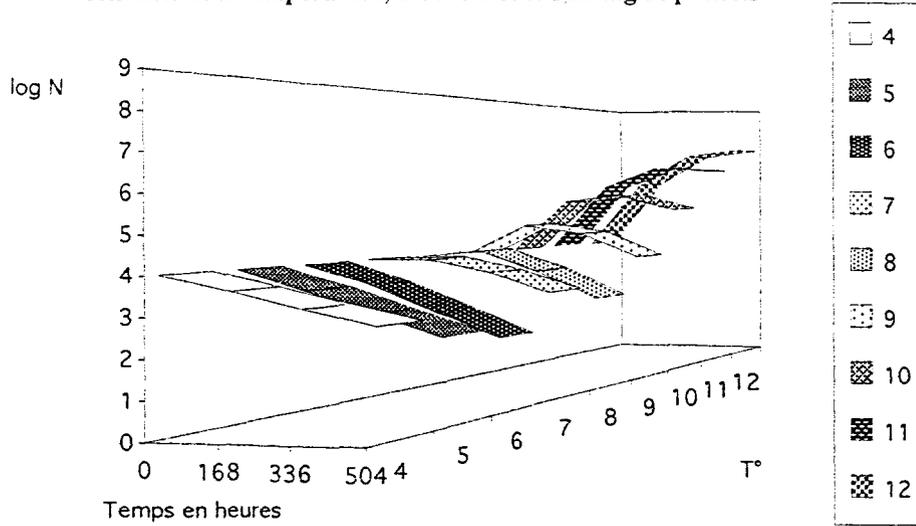


Fig 71 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction de la température, à 4% NaCl et 2 mg de phénols

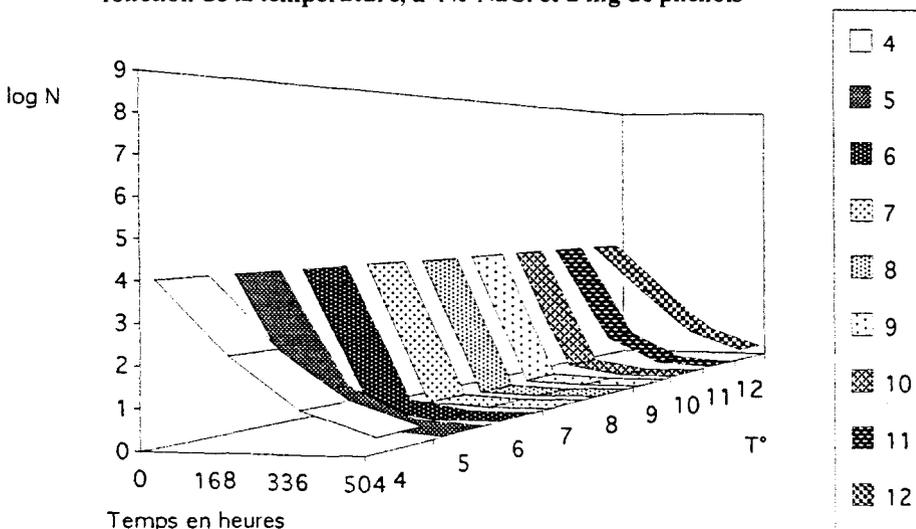


Fig 72 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 4°C

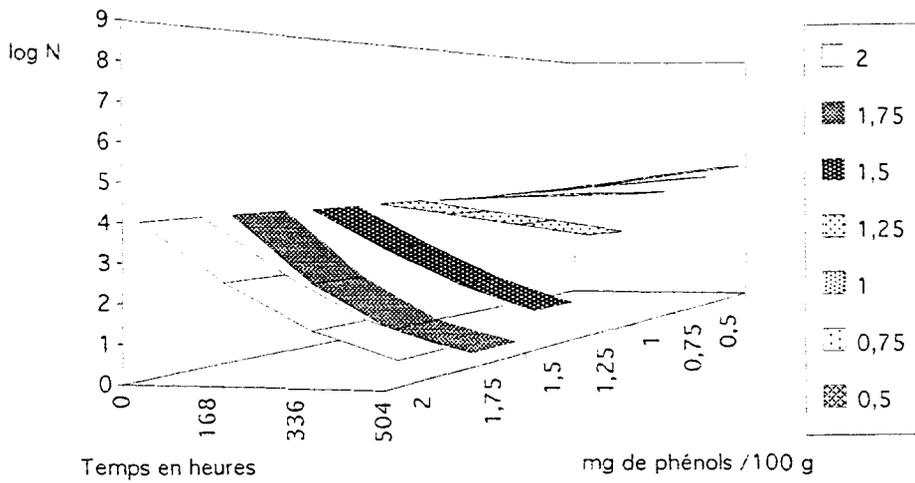


Fig 73 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 4°C.

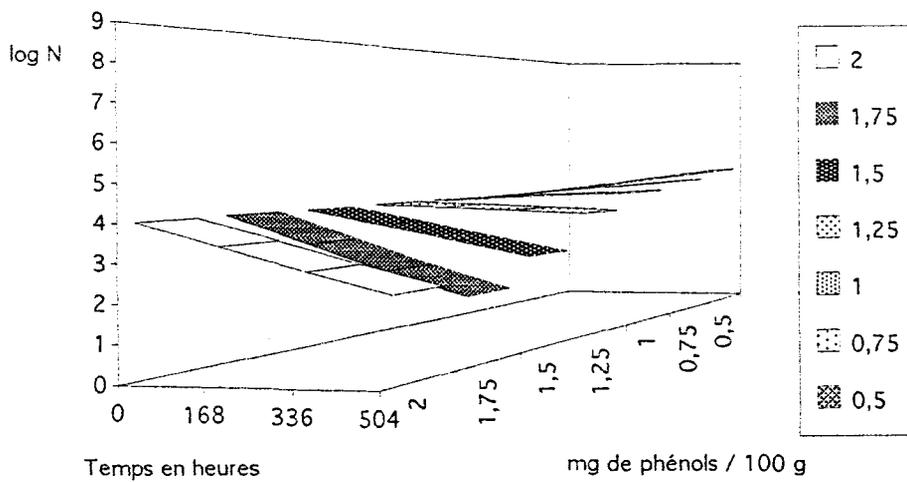


Fig 74 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 4°C

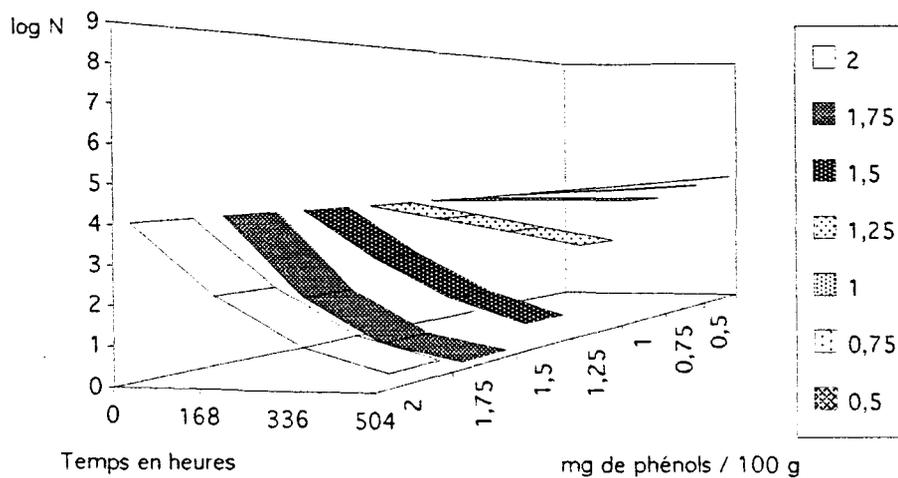


Fig 75 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 8°C

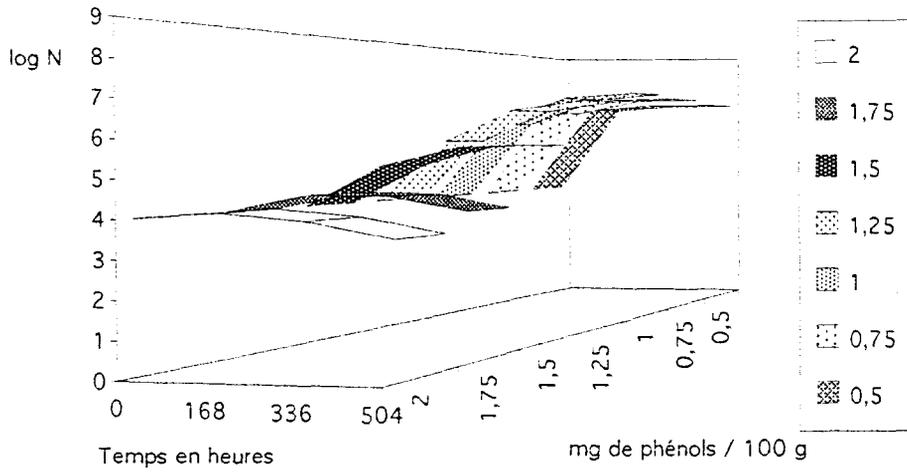


Fig 76 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 8°C

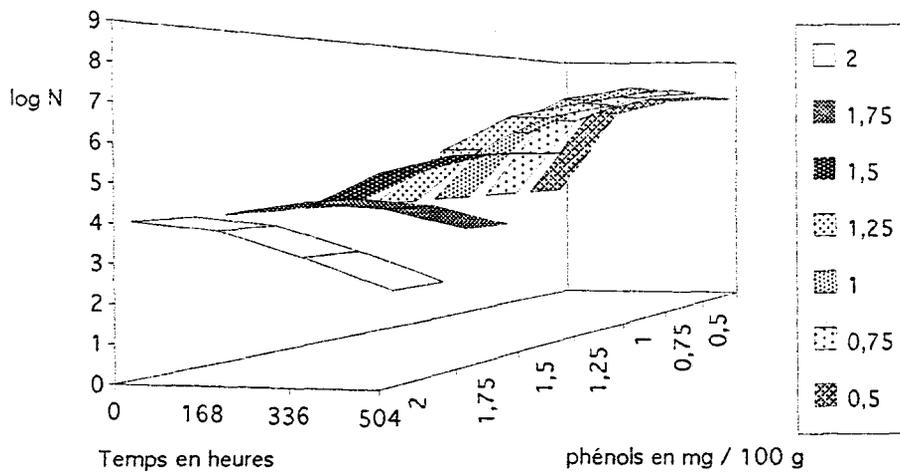


Fig 77 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 8°C

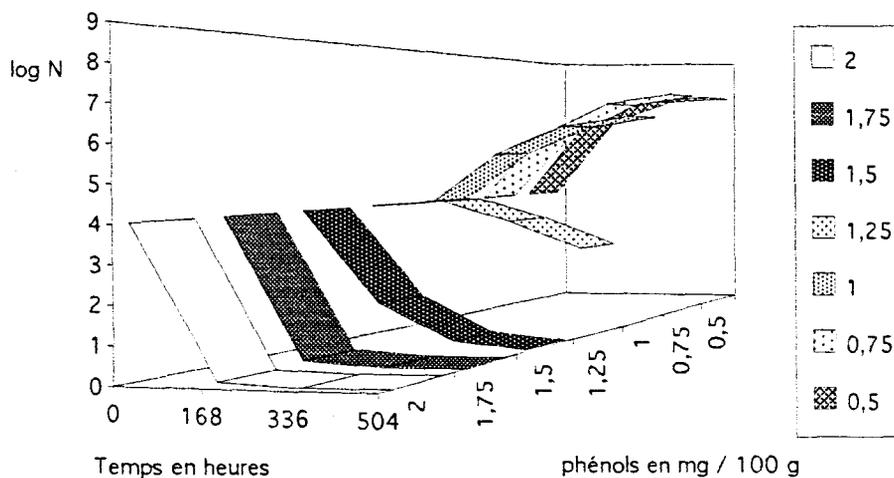


Fig 78 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 2% NaCl et 12°C

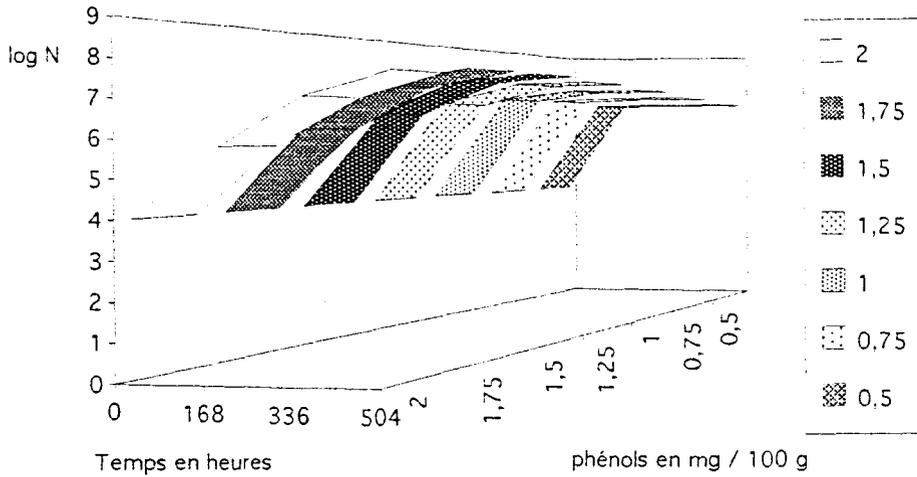


Fig 79 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 3% NaCl et 12°C

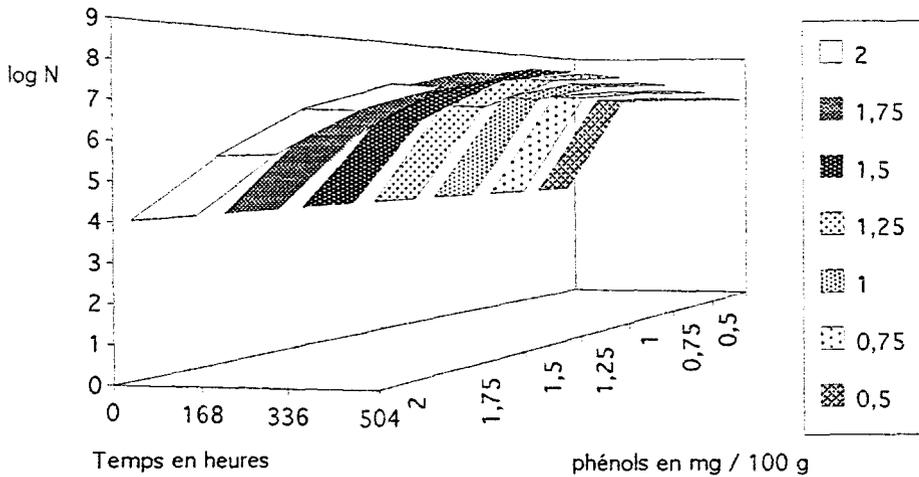


Fig 80 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de phénols, à 4% NaCl et 12°C

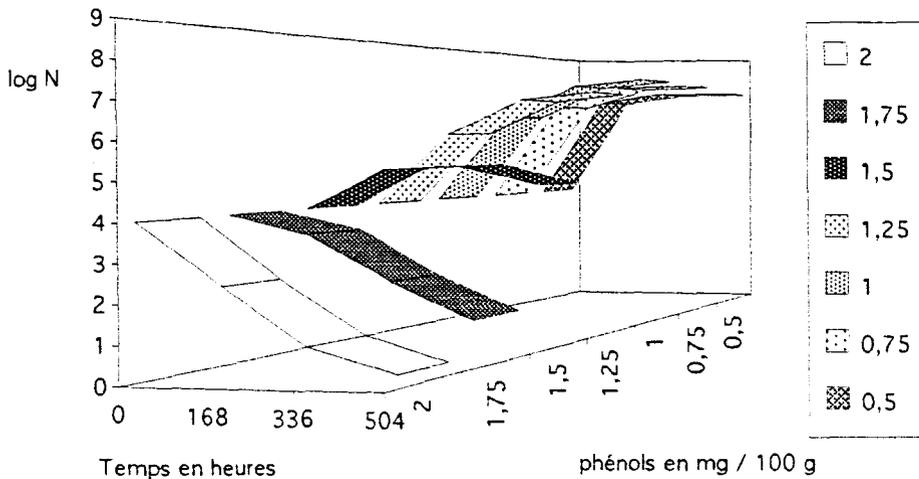


Fig 81 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 0,5 mg de phénols/100 g

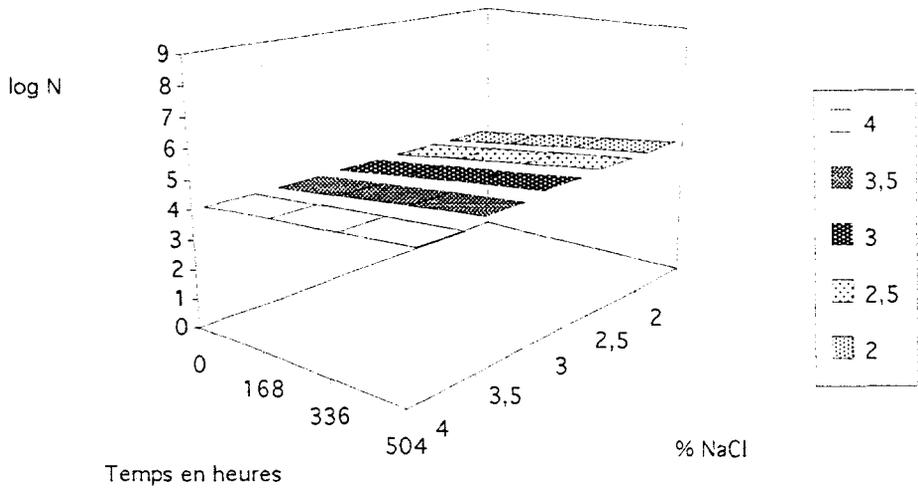


Fig 82 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 1,25 mg de phénols / 100 g

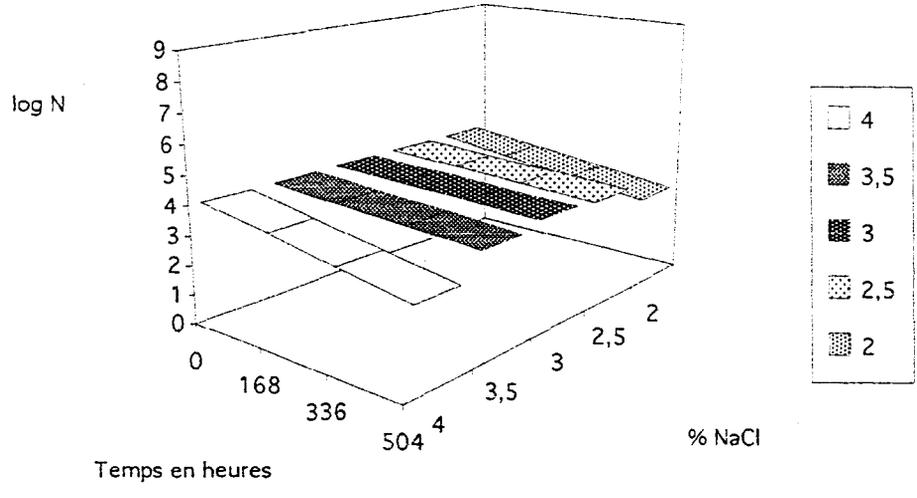


Fig 83 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 4°C et 2 mg de phénols/100 g

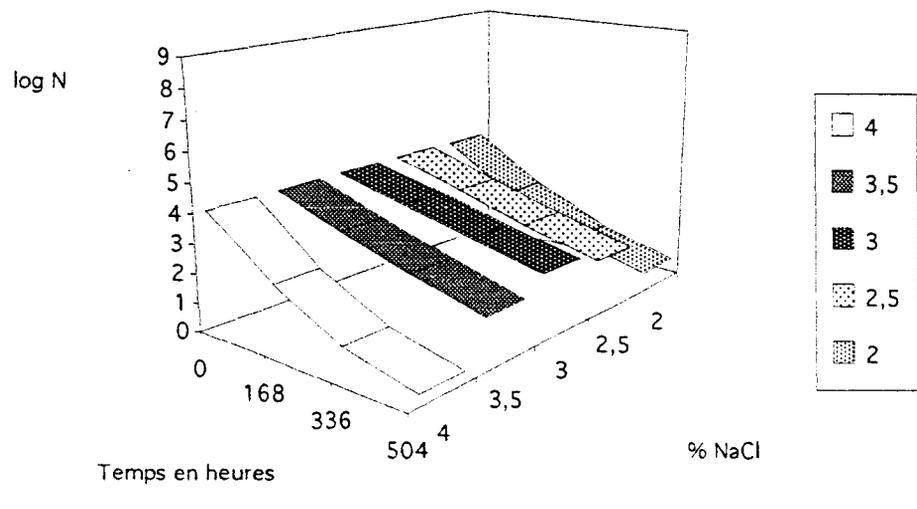


Fig 84 : Evolution au cours du temps du logN de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 0,5 mg de phénols / 100 g

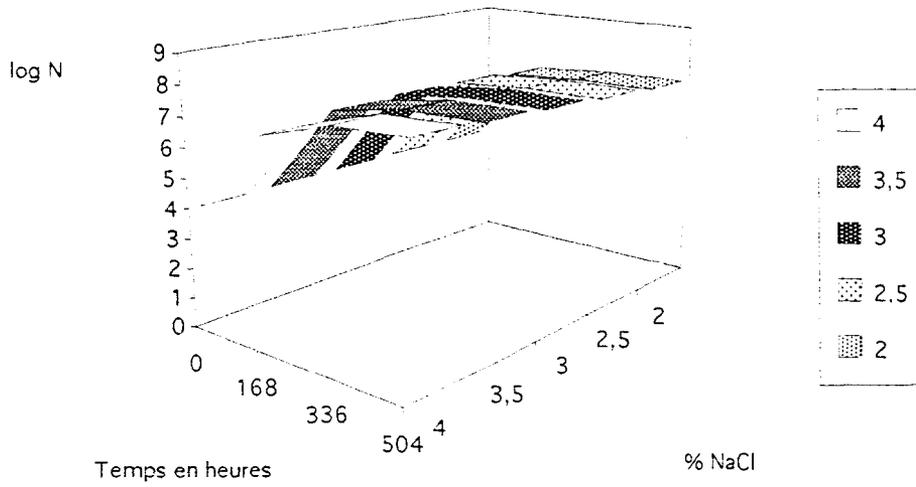


Fig 85 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 1,25 mg de phénols / 100 g

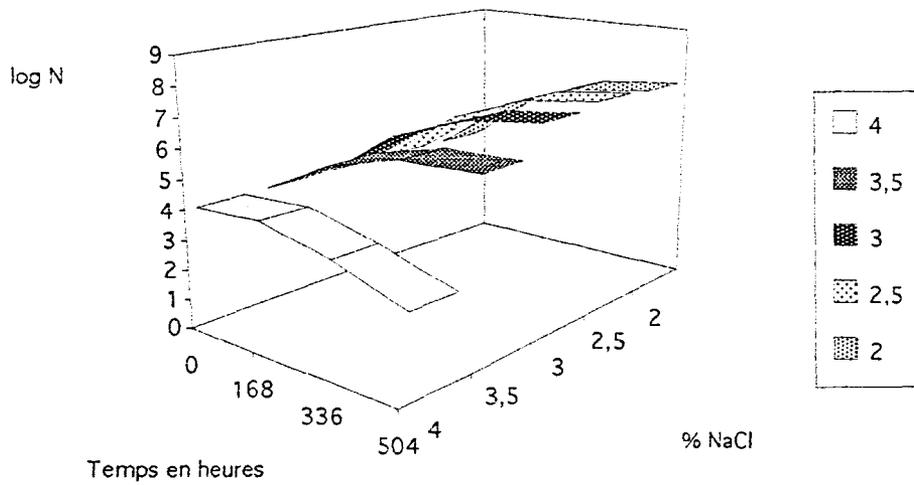


Fig 86 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 8°C et 2 mg de phénols / 100 g

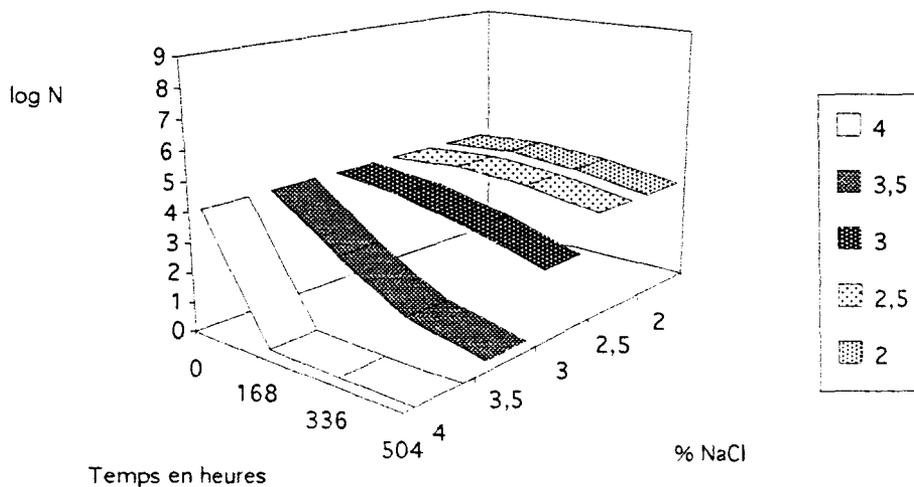


Fig 87 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 0,5 mg de phénols / 100 g

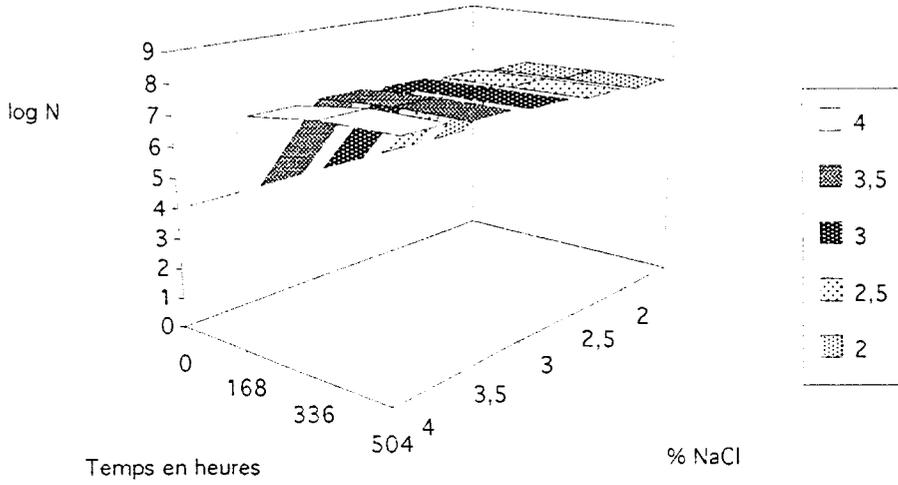


Fig 88 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 1,25 mg de phénols / 100 g

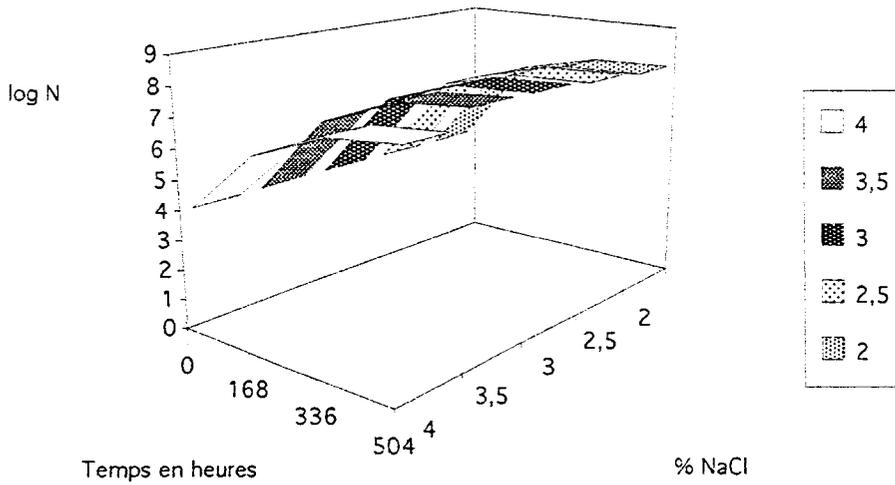
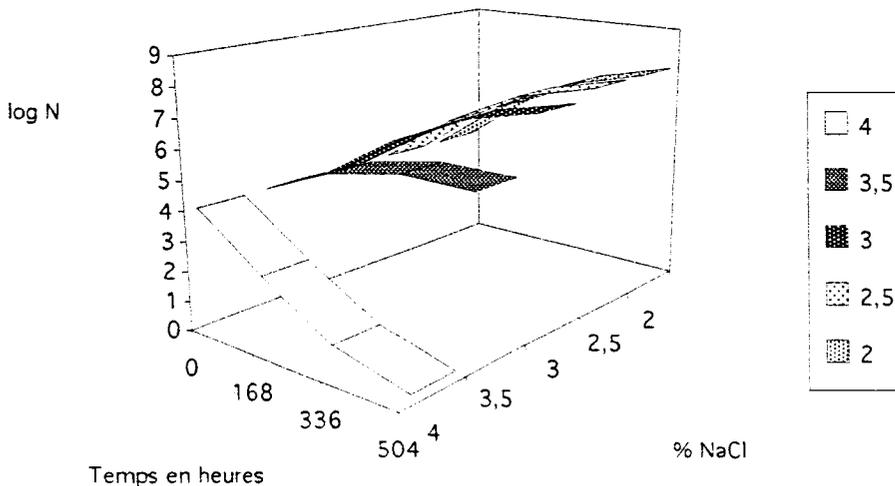


Fig 89 : Evolution au cours du temps du log N de Listeria en fonction du taux de NaCl, à 12°C et 2 mg de phénols / 100 g



Ce type de situation, avec des étapes successives de stockage à différentes températures est représentative du devenir d'un saumon fumé juste après sa production.

Pour illustrer l'intérêt de cet outil, nous avons pris trois exemples fictifs présentés dans le Tableau 1D.

Le cycle 1 fait intervenir de faibles températures comme 4 et 5°C, qui représentent de bonnes températures de conservation. Dans le cycle 2 les températures sont un peu plus élevées de l'ordre de 7 et 8°C qui peuvent être rencontrées éventuellement dans les meubles réfrigérés de la distribution. Enfin dans le cycle 3 ou 4 les températures de 10 et 12°C sont assimilées à une rupture de la chaîne du froid. Le nombre de cycles n'est pas limitatif et d'autres combinaisons taux de phénols taux de sel peuvent être prises en compte, pour aboutir à des représentations graphiques comme les Figures 90 et 91, qui illustrent ces trois cas.

La simplicité d'utilisation des outils graphiques présentés ici rend le modèle "continu" attrayant quand à la modélisation de l'évolution de la population *Listeria* dans le saumon fumé. En effet la visualisation d'un graphe en trois dimensions permet d'évaluer le risque encouru par un produit en fonction des facteurs température, taux de sel et taux de phénols.

La DLC des produits, établie sous la responsabilité du producteur, est difficile à déterminer en raison des différents facteurs qui interviennent sur la qualité microbiologique du produit (température et temps de stockage, caractéristiques intrinsèques du saumon : taux de sel et taux de phénols). La possibilité, qu'offre le modèle "continu", de combiner différentes étapes de stockage, faisant varier le couple temps / température en fonction des caractéristique du saumon, devrait être très utile aux producteurs pour déterminer de façon plus réaliste de la durée de vie du produit.

Cependant, ce modèle mériterait d'être amélioré pour gagner en précision de prévision mais aussi en augmentant le nombre des valeurs prédites surestimées, afin de limiter les risques d'erreur pouvant avoir des répercussions sur la santé publique

En effet, ce modèle préliminaire établi à partir d'une seule souche (*L. monocytogenes* 4b ATCC 19115) a permis de montrer l'intérêt et l'importance de l'intensité du fumage (visualisée par le taux de phénols), mais ne rend pas compte de la variabilité des souches et plus spécifiquement à 4°C. En outre, les réponses observées ne tiennent pas compte des flores de compétition comme la flore lactique prépondérante en fin de stockage.

De même, des challenge-tests supplémentaires sur saumons seraient nécessaires pour valider le modèle sur un domaine définition du facteur phénols plus important, dans la limite de la réalisation technologique.

Cycle	Log N de <i>Listeria</i> / g	Température de stockage	Temps de stockages	log N de <i>Listeria</i> en fin de cycle
Premier cas				
Saumon à 0,75 mg de phénols / 100g, 3% NaCl, taux de contamination 10 UFC/g				
1	1	4°C	12 jours = 288 H	1,16
2	1,16	7°C	6 jours = 144 H	2,64
3	2,64	12°C	2 jours = 48 H	4,52
Deuxième cas				
Saumon à 1 mg de phénols / 100g, 3% NaCl, taux de contamination 10 UFC / g				
1	1	5°C	9 jours = 216 H	1,22
2	1,22	8°C	6 jours = 144 H	3,05
3	3,05	10°C	3 jours = 72 H	5,21
4	5,21	12°C	1 jour = 24 H	5,81
Troisième cas				
Saumon à 1 mg de phénols / 100 g, 3% NaCl, taux de contamination 100 UFC / g				
1	2	5°C	9 jours = 216 H	2,35
2	2,35	8°C	6 jours = 144 H	4,67
3	4,67	10°C	3 jours = 72 H	6,42
4	6,42	12°C	1 jour = 24 H	6,79

Tableau ID : Evaluation de la population *Listeria* au cours d'un stockage faisant varier le couple temps / température.

Fig 90 : Evolution de la population *Listeria* dans un saumon à 0,75 mg de phénols/100g et 3% de NaCl, en fonction du couple temps / température de stockage.

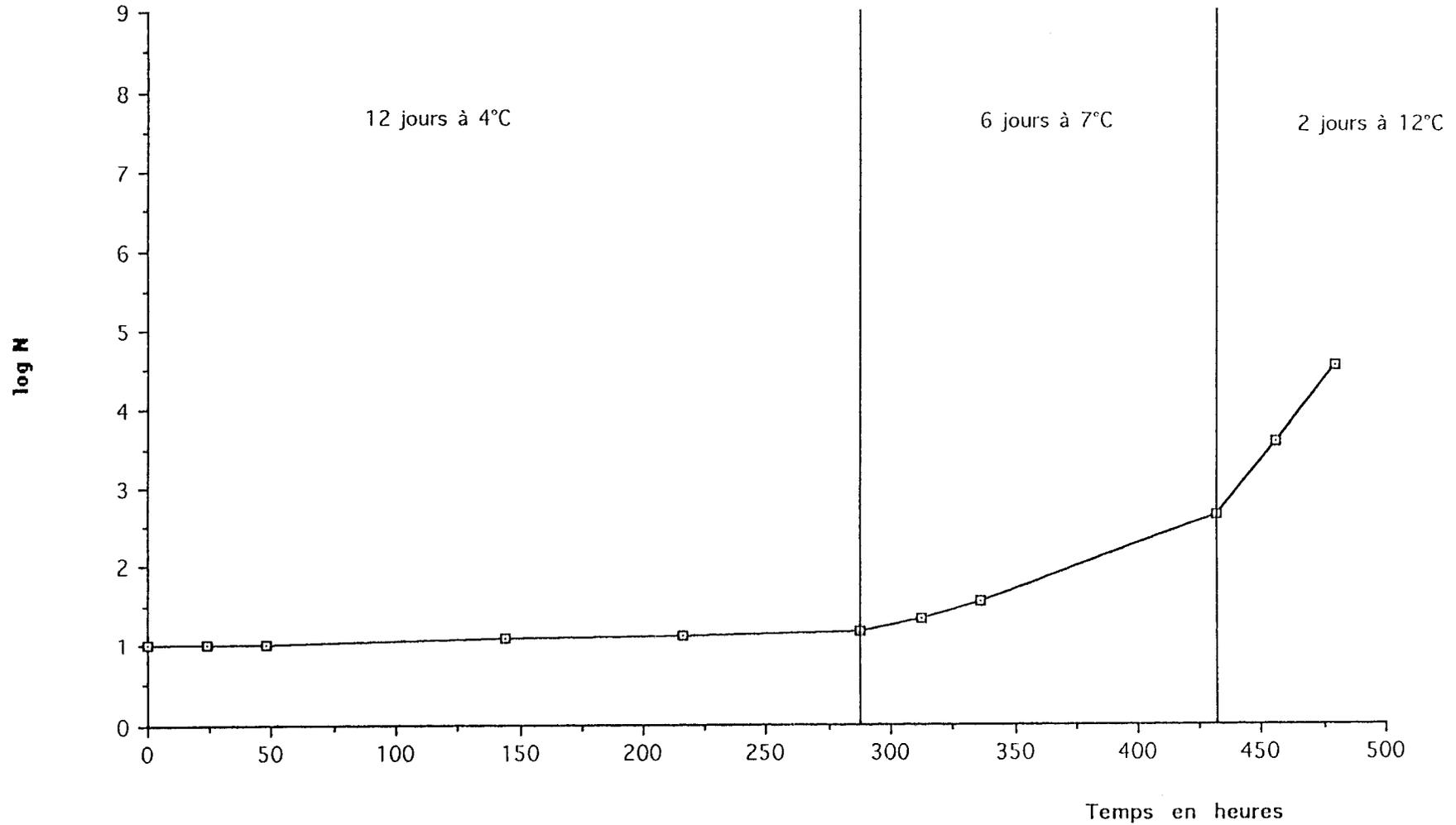
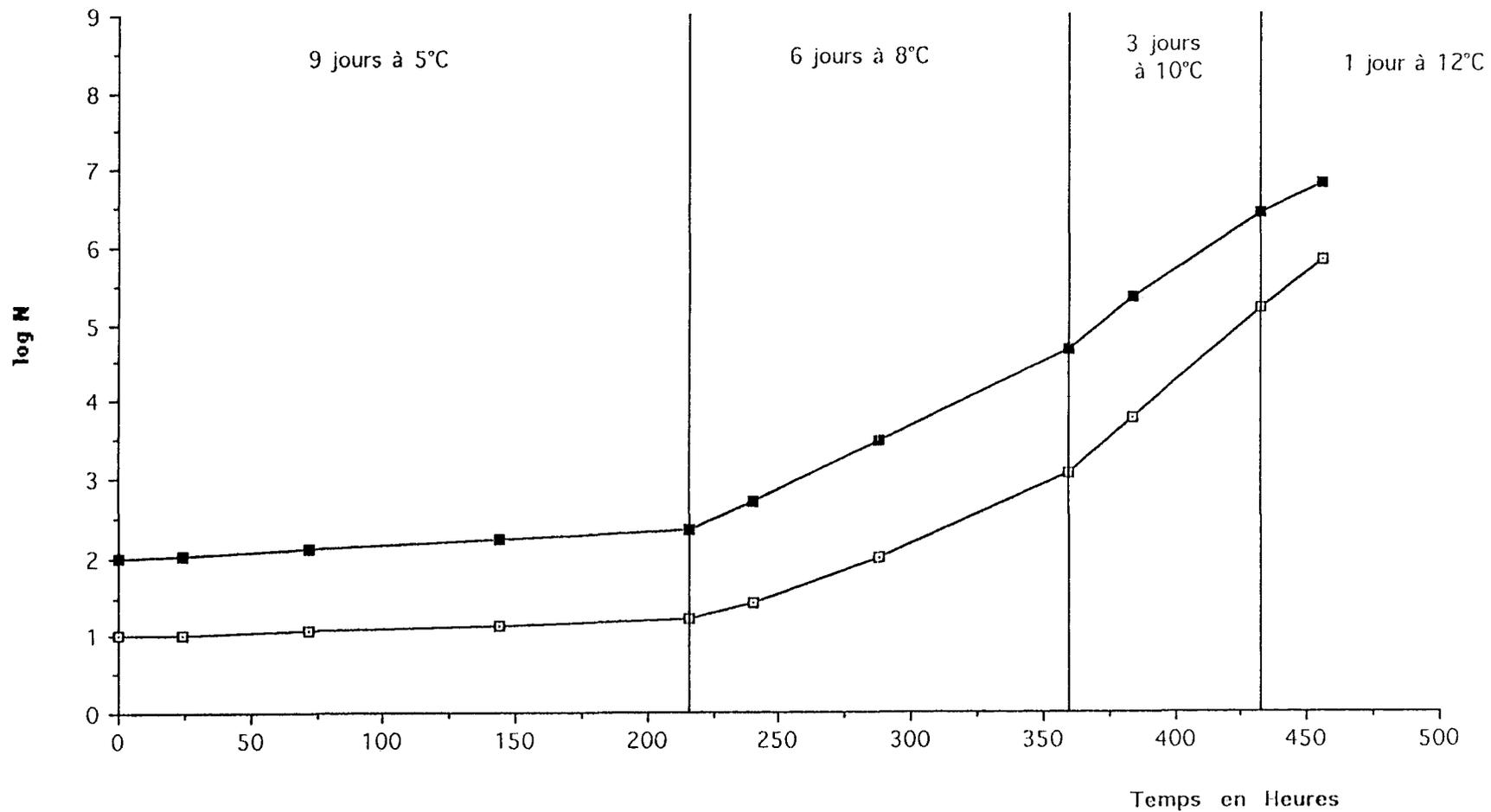


Fig 91 : Evolution de la population Listeria dans un saumon à 1 mg de phénols/100g et 3% de NaCl, en fonction du couple temps / température de stockage.



CONCLUSION GENERALE

L'étude de l'incidence de *Listeria* dans le saumon fumé commercialisé en France, avec 76 % d'échantillons positifs dont 21% en *Listeria monocytogenes*, a révélé l'importance du problème *Listeria* dans ce produit.

L'analyse de deux lignes de transformation de saumon fumé a mis en évidence une contamination hétérogène dans le premier cas et au contraire homogène dans le second, démontrant le caractère aléatoire de la contamination de l'outil de production. Celle-ci apparaît à n'importe quel stade du procédé et reflète la spécificité d'un atelier où seules des actions correctives spécifiques peuvent être mises en place. L'identification de la voie de contamination est la première étape pour limiter voire éliminer la présence de *Listeria*. Elle n'a d'intérêt que si elle s'intègre dans une démarche d'assurance qualité, où le système HACCP a fait ses preuves. Des tests de conservation à 4 et 8°C ont montré le caractère impératif d'un stockage à 4°C, la température de 8°C ne pouvant être retenue en raison du développement de *Listeria*.

Pour un échantillon faiblement contaminé (positif pour la recherche dans 25 g) mais dont le taux est inférieur à 100 UFC / g, le stockage à 4°C sans aucune rupture de la chaîne du froid ne doit jamais excéder 28 jours. La température rigoureuse de 4°C étant difficile à appliquer en circuit de distribution, il nous semble plus raisonnable de ne pas dépasser 21 jours de stockage.

Les méthodes traditionnelles, ayant généralement un long délai de réponse (11 jours pour la méthode IPL et 5 jours pour la méthode V 08-055), ont fait place à des techniques rapides basées sur des réactions immuno-enzymatiques. Celles-ci avec une étape d'enrichissement de 48 heures permettent de répondre en terme de présence / absence en *Listeria spp*. Parallèlement, des kits faisant appel à l'hybridation des acides nucléiques pouvant détecter la présence de *L. monocytogenes* ont été développés.

L'étude de ces techniques traditionnelles et alternatives a montré leur efficacité appliquée aux différents états du saumon : frais ou fumé, réfrigéré ou congelé.

La mise en place de kits spécifiques de la détection de *L. monocytogenes* a souligné leurs avantages dans l'analyse des produits finis. Les kits *Listeria spp* ne sont pas dépréciés pour autant et trouvent leur utilité dans les études d'écologie d'atelier, où toutes les espèces de *Listeria* sont des indicateurs de contamination de *L. monocytogenes*.

L'existence d'une recommandation microbiologique concernant *L. monocytogenes*, a conduit à la mise en place d'un dénombrement direct, par étalement de 0,1 ml sur gélose PALCAM. Afin de minimiser le risque d'une estimation par défaut, due aux bactéries stressées incapables de se développer sur un milieu sélectif, une étape de revivification a été introduite.

La finalité de ces recherches, sur les techniques de détection et du dénombrement direct, est la mise au point d'un protocole appliqué aux produits en fin de fabrication ou ayant atteint la DLC. Dans le cas d'un produit en fin de fabrication, un dénombrement direct précédé d'une étape de revivification de 3 heures 30 à 20°C est ajouté à la méthode V 08-055.

Pour un produit ayant atteint la DLC, un dénombrement direct, sans revivification, suivi d'une identification par sondes nucléiques est effectué.

Pour étudier les paramètres de développement de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé, nous avons eu recours à la microbiologie prévisionnelle.

Considérant la température de stockage, le taux de sel et l'intensité de fumage, comme facteurs représentatifs du procédé de transformation et susceptibles d'influencer le comportement de *Listeria*, nous avons établi un plan factoriel complet à 3 facteurs et 3 niveaux.

L'importance de la température de stockage à 4°C a été démontrée : elle permet de limiter le développement de *Listeria*. Cependant, le taux de phénols indicateur de l'intensité de fumage semble être décisif pour amorcer un phénomène de décroissance bactérienne. Celui-ci est observé pour des traitements faisant intervenir un taux de 2 mg / 100 ml de phénols

L'action du NaCl aux taux utilisés est faible et étroitement liée aux autres facteurs.

Une interaction entre température et taux de phénols a pu être mise en évidence. Pour une combinaison de la température de 4°C et d'un taux de phénols de 2 mg / 100 ml, une décroissance est observée, indiquant la supériorité de l'effet phénols sur celui de la température. Pour la combinaison d'une température de 12°C et 2 mg de phénols /100 ml le phénomène inverse est obtenu s'accompagnant cette fois d'une croissance bactérienne.

Enfin la combinaison 12°C, 2 mg de phénols /100 ml et 4% NaCl met en évidence une interaction phénols /sel, où le sel intervient en privilégiant la décroissance.

L'intensité de fumage, mesurée à l'aide de l'indice des phénols, est un paramètre qui mériterait d'être contrôlé au cours du procédé de transformation. Cependant, un taux de 2 mg / 100g favorisant la décroissance de *Listeria* semble difficile à appliquer au saumon fumé. En effet, pour un taux de cet ordre, le produit fini ne correspondrait plus aux critères organoleptiques du consommateur.

Les données acquises ont permis d'établir 2 modèles mathématiques. Le premier dit "discontinu" est constitué de deux sous modèles représentant la croissance d'une part et la décroissance d'autre part. Ce modèle bien que très proche des observations expérimentales, ne peut pas être utilisé en microbiologie prévisionnelle. En effet, il nécessite une connaissance, *a priori*, de l'évolution de *Listeria* (croissance ou décroissance) en fonction de la combinaison des facteurs considérés.

Le deuxième modèle dit "continu" a l'originalité de prédire l'une ou l'autre des évolutions de *Listeria* enregistrées dans le même plan expérimental, à savoir croissance ou décroissance bactérienne.

La validité de ce modèle, vérifiée à l'aide de challenge-tests sur saumons fumés, a montré une bonne corrélation entre valeurs prédites et observées.

Le taux d'inoculation utilisé au cours des challenge-tests ne semble pas interférer dans les résultats.

En outre, un effet souche a pu être mis en évidence, particulièrement à la température de stockage de 4°C. Celle-ci peut donc être remise en question pour une conservation dans les meilleures conditions. Elle semble encore trop élevée pour minimiser le risque de développement de certaines souches de *Listeria*.

Cette observation souligne une fois de plus l'importance de la température de stockage qui d'un point de vue technologique est le paramètre opératoire le plus simple à mettre en oeuvre et ne modifie en rien le caractère organoleptique du produit fini.

Ce modèle constitue une base de travail pour l'établissement de prévisions réalistes de l'évolution de *L. monocytogenes* dans le saumon fumé. Sa sensibilité pourra être améliorée par l'utilisation de diverses souches de *Listeria*, afin d'intégrer la variabilité des souches mise en évidence à 4°C.

Des challenge-tests supplémentaires sur saumons fumés représentatifs des différents facteurs étudiés (notamment de l'intensité de fumage) permettront l'application du modèle mathématique sur l'ensemble des domaines de définition.

La représentation graphique tridimensionnelle réalisée à partir du modèle continu, est simple et permet une visualisation rapide de l'évolution de *Listeria* en fonction de la connaissance des facteurs T° de stockage, taux de sel et taux de phénols. L'intérêt du modèle "continu" de pouvoir combiner différentes étapes de stockage, faisant varier le couple temps / température, est de déterminer de façon plus réaliste la DLC du produit, en fonction de ses caractéristiques : taux de sel et taux de phénols.

Le rôle du modèle dans l'évaluation de problèmes éventuels reste celui d'un guide et ne doit pas remplacer le test microbiologique, ni l'expérience du bactériologiste.

L'intensité de fumage prise en compte pour la première fois dans une étude de microbiologie prévisionnelle, a montré l'importance de ce facteur, qui doit être pris en considération comme paramètre intervenant dans le développement de *Listeria*.

La reconstitution de l'intensité de fumage à l'aide de fumée liquide et son suivi par l'indice de phénols pourraient être étendus en microbiologie prévisionnelle à d'autres produits alimentaires, notamment dans l'industrie de la charcuterie.

Pour une bonne exploitation des résultats, le nombre de facteurs utilisés ici est encore trop restreint. Notre étude pourrait être complétée en faisant intervenir cette fois non plus des facteurs physico-chimiques du produit, mais des facteurs liés aux bactéries ; comme l'état physiologique des bactéries (stress) ou la flore de compétition, notamment la flore lactique.

Certaines bactéries lactiques, reconnues pour avoir une activité antagoniste contre les bactéries pathogènes et les bactéries d'altération (JEPPESEN et HUSS 1993a), sont actuellement étudiées comme agents pouvant augmenter la durée de vie des produits de la mer (JEPPESEN et HUSS 1993 b, LEROI *et al.* 1995).

D'un point de vue plus fondamental, il serait intéressant d'identifier le ou les composés du fumage ayant une action inhibitrice sur *L. monocytogenes*, et tenter d'en favoriser la production au cours du fumage, sans pour autant modifier les critères organoleptiques du produit fini.

Un autre aspect fondamental, est l'étude de l'état de virulence des souches de *Listeria*.

Les données bibliographiques relatives aux modèles expérimentaux, permettant de tester la virulence des souches de *L. monocytogenes*, mériteraient d'être exploitées : l'établissement d'une relation entre virulence bactérienne et substrat alimentaire présenterait un intérêt certain.

En effet, 2 aliments présentant une contamination en *L. monocytogenes* de même sérovar, n'ont vraisemblablement pas la même probabilité d'être à l'origine de cas de listériose. Les aliments les plus fréquemment mis en cause dans les épidémies de listériose sont les produits carnés et les produits laitiers. Dans le cas des poissons fumés souvent contaminés en *L. monocytogenes*, à notre connaissance, aucun cas de listériose lié à ce type d'aliment a été décrit. Nous sommes en droit de nous demander si l'aliment a un effet sur la manifestation de la virulence.

Des souches mises en présence de différentes conditions de culture (représentées par exemple par les divers traitements du plan d'expériences de l'étude de microbiologie prévisionnelle) inoculées artificiellement par voie orale à des souris, devraient nous fournir des informations sur la relation entre la virulence et certains facteurs rencontrés au cours de la transformation de l'aliment.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME.

Fumée - Fumage.

Additifs et auxiliaires de fabrication dans les industries Agro-Alimentaires (Chapitre 4).
Collection sciences et Techniques Agro-alimentaires. 1984. pp 481-570.

ANONYME.

Listeria monocytogenes. Manuel d'Information.

Direction de la protection de la santé. Santé et Bien Etre Social. Canada. Novembre 1991 a.

ANONYME

Listeria monocytogenes. Recommendations by the National Advisory Committee on
Microbiological criteria for Foods.

Int. J. Food Microbiol., 1991 b, **14** : 185 - 246.

ANONYME.

Listeria monocytogenes et aliments. Information.

B. I. D. 1993, **1** : 38-55.

ADAIR C., KILSBY D. C., WHITTALL P. T.

Comparison of the Schoolfied non linear Arrhenius model and the square root model for
predicting bacterial growth in foods.

Food Microbiol., 1989, **6** : 7-18.

ADAMS M. R., LITTLE C. L., EASTER M.C.

Modelling the effect of pH acidulant ant temperature on the growth rate of *Yersinia*
enterocolitica.

J. Appl. Bacteriol., 1991, **71** : 65-71.

AMOAKO E. B., SYED TOORA, ABLETT R. F., SMITH J.

Evaluation of the ability of primary selective enrichment to resuscitate heat injured and
freeze injured *Listeria monocytogenes* cells.

Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (9) : 3177-3179.

BARBOSA W. B., CADEBO L., WEDERQUIST H. J., SOFOS J. N.,
SCHMIDT G. R.

Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth.

J. Food Prot., 1994, **57** (9) : 765-769.

BEERENS H., TAHON-CASTEL M. M.

Milieu a l'acide nalidixique pour l'isolement des *Streptocoques*, *D. pneumoniae*, *Listeria*, *Erysipelothrix*.

Ann. Inst. Pasteur., 1966, **111** : 90-93.

BEN EMBAREK P. K.

Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods : a review.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **23** : 17-34.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.

BREEDD R. S, MURRAY E. G. .D., SMITH N. R.

Septième Edition, 1957, Ed Williams and Wilkins Company. Baltimore. London.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY

BUCHANAN R. E, GIBBONS N. E.

Huitième Edition, 1974, Ed Williams and Wilkins Company. Baltimore. London.

BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIQUE BACTERIOLOGY

SNEATH P. H. A., MAIR N. S., SHARPE M. E., HOLT J. G.

Huitième Edition, 1986, Ed Williams and Wilkins Company. Baltimore. London.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY

HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T.

Neuvième Edition, 1994, Ed Williams and Wilkins Company. Baltimore. London.

BOERLIN P., BANNERMAN E., ISCHER F., ROCOURT J., BILLE J.

Typing *Listeria monocytogenes* : a comparison of random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods.

Res. Microbiol., 1995, **146** : 35-49.

BOJSEN-MOLLER J.

Human listeriosis-diagnostic, epidemiological and clinical studies.

Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Section B., 1972, Suppl. **229** : 1-157.

BOURGEOIS M. C.

Prédiction de la durée de conservation des produits.

Techniques d'analyse et de contrôle dans les IAA.

Tome 3 : coordonateurs : Bourgeois. C. M., Leveau. J. Y.

Coll Sciences et Techniques Agroalimentaires . Ed Lavoisier. 1991

BOYLE D. L., SOFOS J. N., MAGA J. A.

Inhibition of spoilage and pathogenic microorganisms by liquid smoke from various woods.
Lebensm. Wiss. Technol., 1988, **21** : 54-58.

BREMER P. J., COOKE M. D.

A laboratory based study an the accumulation and excretion of *Listeria spp* in king Salmon
(*Oncorhynchus tshawytcha*).

J. Aquatic Food Product Technology. 1993, **2** (4) : 67-68.

BRISSONNET F., BOUIX M., RUSSEL A., LEVEAUJ. Y.

Le stress bactérien et ses conséquences en génie de l'hygiène.

I. A. A., Cahier Scientifique, MARS 1994, **111** : 106-114.

BROSCH R., CATIMEL B., MILON G., BUSCHRIESER C., VINDEL E.,
ROCOURT J.

Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food,
human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics.

J. Food Prot., 1993, **56** (4) : 296-301.

BUCHANAN R. L., STAHL H. G., ARCHER D. L.

Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in
foods.

Food Microbiol., 1987, **4** : 269-275.

BUCHANAN R. L., STAHL H. G., WHITING R. C.

Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium
nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*.

J. Food Prot., 1989, **52** (12) : 844-851.

BUCHANAN R. L., PHILLIPS J. G.

Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride
content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria
monocytogenes*.

J. Food Prot., 1990, **53** (5) : 370-376.

BUSCH S. V., DONNELLY C. W.

Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria
monocytogenes* and *Listeria innocua*.

Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (1) : 14-20.

CATTEAU M.

Méthodes de recherche et de dénombrement traditionnelles.
Journée *Listeria* : Le point. 2 Juin 1992. Ed Institut Pasteur.

CATTEAU M.

Listeria : fréquence et croissance dans les aliments.
Journée *Listeria* : Le point. 27 Mai 1994. Ed Institut Pasteur.

CHAN W. S., TOLEDO T., DENG J.

Effect of smokehouse temperature, humidity and air flow on smoke penetration into fish muscle.
J. Food Sci., 1975, **40** (2) : 240-243.

CIVERA T., PARISI E., AMERIO G. P., GIACCONE V.

Shelf-life of vacuum-packed smoked salmon : microbiological and chemical changes during storage.
Arch. Lebensm. Hyg., 1995, **46** : 1-24.

CLIQUET S., DURIER C., KOBILINSKY A.

La planification expérimentale. Exemples de plans d'expériences pour l'optimisation de la production de *Bradyrhizobium japonicum*.
Cah. Techn. I. N. R. A., 1993, **32** : 47-68.

COLBURN K. G., KAYSNER C. A., ABEYTA C., WEKELL M. M.

Listeria species in California coast estuarine environment .
Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** : 2007-2011.

COLE M. B., DAVIES K. W., MUNRO G., HOLYOAK C. D., KILSBY D. C.

A vitalistic model to describe the thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*.
J. Ind. Microbiol., 1993, **12** : 232-239.

COSSART P.

Listeria monocytogenes : un modèle à l'interface génétique bactérienne et biologie cellulaire.
Bull. Soc. Fr. Microbiol., 1992, **7** (4) : 247-250.

COX L. J., SIEBENGA S., PEDRAZZINI C., MORETON J.

Enhanced haemolysis agar (EHA)-an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes*.
Food Microbiol., 1991 a, **8** : 37-49.

COX L. J., SIEBENGA S., PEDRAZZINI C.

Performance of enhanced haemolysis agar compared to Oxford medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from food enrichment broths.

Food Microbiol., 1991 b, **8** : 51-62.

CURTIS G. D. W., MITCHELL R. G., KING A. F., GRIFFIN E. J.

A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*.

Let. Appl. Microbiol., 1989, **8** : 95-98.

CUTTING C. L., SPENCER R.

Fish and fish products.

In " Quality control in the food industry". Vol 2., 1968.

HERSCHDORFER M. (Ed.), p : 303-353. Academic press London and New York.

CZAJKA J., BATT C. A.

Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolated in food-borne outbreaks of listeriosis by Randomly Amplified Polymorphic DNA Patterns.

J. Clin. Microbiol., 1994, **32** (5) : 1280-1287.

CZUPRYNSKI C. J.

Host defense against *Listeria monocytogenes* : implications for food safety.

Food Microbiol., 1994, **11** : 131-147.

DAVEY K. R.

A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase.

J. Appl. Bacteriol., 1989, **67** : 483-488.

DILLON R. M., PATEL T. R.

Listeria in seafoods : a review.

J. Food Microbiol., 1992, **55** (12) : 1009-1015.

DILLON R., PATEL T.

Effect of cold smoking and storage temperatures on *Listeria monocytogenes* in inoculated cod fillets (*Gadus morhus*).

Food Res. Int., 1993, **26** (2) : 97-101.

DILLON R., PATEL T., RATMAN S.

Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **22** : 73-77.

DONNELLY C. W

Listeria monocytogenes .

Chap 8 in "Foodborne disease handbook. Diseases caused by bacteria". Vol 1.,1994.

HUI Y. H., GORHAM J. R., MURRELL K. D., CLIVER D. O.(Ed.), p : 215-252.

Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong.

EKLUND M. W., POYSKY F. T., PARANJPYE R. N.,LASHBROOK L. C.,

PETERSON M. E., PELROY G. A.

Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants.

J. Food Prot., 1995, **58** (5) : 502-508.

ETTRIQUI A.

Listeria .

Microbiol. Hyg. Alim., 1994, ISBN 9973-765-12-5 : 30-36.

FAITH N. G., YOUSEF A. E., LUCHANSKY J. B.

Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke.

J. Food Safety., 1992, **12** : 303-314.

FARBER J. M.

Listeria monocytogenes in fish products.

J. Food. Prot., 1991, **54** (12), 922-924.

FARBER J. M, PETERKIN P. I.

Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen.

Microbiol. Rev., 1991, **55** (3) : 476-511.

FLANDERS K. J.,DONNELLY C. W.

Injury, resuscitation and detection of *Listeria spp*, from frozen environments.

Food Microbiol.. 1994, **11** : 473-480.

FRASER J. A., SPERBER W. H.

Rapid detection of *Listeria spp* in food and environmental samples by esculin hydrolysis.

J. Food Prot. ,1988, **51** (10) : 762-765.

FRAZIER W. C., WESTHOFF D.C.

Contamination, preservation, and spoilage of fish and other seafoods.
Chap 14 in "Food Microbiology" 3ème édition 1978, p : 243-255.
Mc Graw-Hill Book company. New York.

FUCHS R. S., SURENDRAN P. K.

Incidence of *Listeria* in tropical fish and fishery products.
Let. Appl. Microbiol., 1989, **9**, 49-51.

FUCHS R. S., SIRVAS S.

Incidence of *Listeria monocytogenes* in a acidified fish product, ceviche.
Let. Appl. Microbiol., 1991, **12**, 88-90.

FUCHS R. S., REILLY P. J. A.

The incidence and significance of *Listeria monocytogenes* in seafoods.
Quality assurance in the fish industry. 1992. HUSS H. H. (Ed.), p : 217-229.
Elsevier Science Publishers.

FUCHS R. S., NICALAIDES L.

Incidence of *Listeria* in hot- and cold-smoked fish.
Let. Appl. Microbiol., 1994, **19** : 394-396.

GERBER D.

Les nouvelles techniques de fumages.
Process, 1994, **1097** : 89-92.

GOEBEL W., LEIMEISTER WACHTER M., KUHN M., DOMANN E..

CHAKRABORTY T., KÖHLER S., BUBERT A., WUENSCHER M., SOKOLOVIC Z.
Listeria monocytogenes - a model system for studying the pathomechanisms of an
intracellular microorganism.
Zbl. Bakt., 1993, **278** : 2-3.

GRAU F. H., VANDERLINDE P. B.

Aerobic growth of *Listeria monocytogenes* on beef lean and fatty tissue : equations
describing the effects of temperature and pH.
J. Food Prot., 1993, **56** (2) : 96-101.

GRAY M. L., STAFSETH H. J., THORP F., SHOLL L. B., and RILEY W. F.
A new technique for isolating listerellae from bovine brain.
J. Bacteriol., 1948, **55** : 471-476.

GRAY M. L., STAFSETH H. J., THORP F.
The use of potassium tellurite, sodium azide, and acetic acid in a selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes*.
J. Bacteriol., 1950, **59** : 443-444.

GUNASINGHE C. P. G. L., HENDERSON C., RUTTER M. A.
Comparative study of two media (PALCAM and OXFORD) for the detection of *Listeria* species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures.
Let. Appl. Microbiol., 1994, **18** : 156-158.

GUYER S., JEMMI T.
Betriebsuntersuchungen zum vorkommen von *Listeria monocytogenes*.
Arch. Lebensm. Hyg., 1990, **41** : 144-146.

GUYER S., JEMMI T.
Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon.
Appl. Environ. Microbiol., 1991, **57** (5) : 1523-1527.

HARRISON M. A., HANG Y. W., CHAO C. H. SHINEMAN T.
Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood.
J. Food Prot., 1991, **54** (7) : 524-527.

HARTEMINK R., GEORGSSON F.
Incidence of *Listeria* species in seafood and seafood salads.
Int. J. Food Microbiol., 1991, **12**, 189-196.

HEFLE S. L.
Immunoassay fundamentals.
Food Technol., Février 1995 : 102-107.

HEFNAWY Y. A., MARTH E. H.
Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in broth supplementes with sodium chloride and held at 4 and 13°C.
Lebensm. Wiss. U. Technol., 1993, **26** (5) : 388-392.

HITCHINS A. D.

Listeria monocytogenes.

FDA Bacteriological Analytical Manual, 1992, 7 TH Edition, Chap 10 : 141-151.

HOBBS G., HODGKISS W.

The bacteriology of fish handling and processing.

Chap 3 in "Developments in food microbiology-1". 1982.

DAVIES R. (Ed.), p : 71-117. Applied Science Publishers. London. New Jersey.

HUDSON J. A.

Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophilia*, *Yersinia enterocolitica* on cold smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse.

Food Microbiol. ,1993, **10** : 61-68.

HUET S., JOLIVET E., MESSEAN A.

La régression linéaire, méthodes et applications en biologie, INRA, Paris. 1992.

HUSS H. H.

Safety of seafood.

Ministry of Fisheries, Danemark. Aout 1991.

HUSS H. H.

Development and use of the HACCP concept in fish processing.

Int. J. Food Microbiol., 1992, **15** : 33-44.

JEMMI T., KEUSCH A.

The behavior of *Listeria monocytogenes* during processing storage of experimentally contaminated hot smoked trout.

Int. J. Food Microbiol., 1992, **15** : 339-346.

JEMMI T.

Listeria monocytogenes in smoked fish : an overview.

Arch. Lebensm. Hyg., 1993, **44** (1) : 10-13.

JEMMI T., KEUSH A.

Occurence of *Listeria monocytogenes* in fresh water fish farms and fish smoking plants.

Food Microbiol., 1994, **11** : 309-316.

JEPPESEN V. F., HUSS H. H.

Characteristics and antagonistic activity of lactic acid bacteria isolated from chilled fish products.

Int. J. Food Microbiol., 1993 a, **18** : 305-320.

JEPPESEN V. F., HUSS H. H.

Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C.

Int. J. Food Microbiol., 1993 b, **19** : 179-186.

JOUVE J. L.

HACCP et système qualité (ISO 9000)

Option Qualité, 1992, **97** : 11-15.

JOUVE J. L.

Le système HACCP.

Partie 1. Chap 2 dans "La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères". 1993. CNERNA-CNRS. Commission " Evaluation de la qualité microbiologique des aliments", p : 15-35. Polytechnica.

JOUVE J. L.

Définitions, utilisation et fonctions des critères microbiologiques.

Partie 1. Chap 3 dans "La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères". 1993. CNERNA-CNRS. Commission " Evaluation de la qualité microbiologique des aliments", p : 36-49. Polytechnica.

JOUVE J. L.

Poissons fumés.

Partie 6. Chap 7 dans "La qualité microbiologique des aliments. Maîtrise et critères". 1993. CNERNA-CNRS. Commission " Evaluation de la qualité microbiologique des aliments", p : 252-362. Polytechnica.

JOUVE J. L.

Critères microbiologiques et *Listeria monocytogenes* : proposition de l'ICMSF. Sécurité Alimentaire. 1-2 Juin 1994 Laval France. Ed. ASEPT.

JUNEJA V. K., DAVIDSON P. M.

Influence of temperature on the fatty acid profile of *Listeria monocytogenes*.

J. Rapid Methods and Automation in Microbiol., 1993, **2** (1) : 73-81.

JUNTTILA J. R., NIEMALA S. I., HIRN J.

Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non haemolytic *Listeria*.
J. Appl. Bacteriol., 1988, **65** : 321-327.

KANEDA V. K., DAVIDSON P. M.

Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria : biosynthesis, function, and taxonomic significance.
Microbiol. Rev., 1991, **55** (2) : 288-302.

KEUSCH A., JEMMI T.

The behavior of *Listeria monocytogenes* during processing and storage of experimentally contaminated hot smoked trout.
Int. J. Food Microbiol., 1992, **15** : 339-346.

KNOCKAERT C.

Optimisation du fumage. Des applications pour le saumon.
Produits de la Mer, Janvier - Février 1993, **17** : 61-65.

LACHICA R.V.

Simplified Henry technique for initial recognition of *Listeria* colonies.
Appl. Environ. Microbiol., 1990a, **56** (4) : 1164-1165.

LACHICA R.V.

Same-day identification scheme for colonies of *Listeria monocytogenes*.
Appl. Environ. Microbiol., 1990b, **56** (4) : 1166-1168.

LAMMERDING A. M., GLASS K. A., GENDRON-FITZPATRICK A.,
DOYLE M. P.

Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice.
Appl. Environ. Microbiol., 1992, **58** (12) : 3991-4000.

LARPENT J. P.

Listeria.

Lavoisier TEC. DOC. Londres. Paris. New York. 1995.

LEE W. H., Mc CLAIN D.

Improved *Listeria monocytogenes* selective agar.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, **52** : 1215-1217.

LENNON D., LEWIS B., MANTELL C., BECROFT D., DAVE B., FARMER K.,
TONKIN S., YEATES N., STAMP R., MICKLESON K.

Epidemic perinatal listeriosis;

Pediat. Inf. Diseases., 1984, **3** : 30-34.

LEROI F., ARBEY N., JOFFRAUD J. J., CHEVALIER F.

Effect of lactic acid starters for extending the shelf life of vacuum-packed cold smoked salmon.

Soumise à " Int. J. Food Sci. Technol." , 1995.

LEUNG C. K., HUANG Y. W., PAUCORBO O. C.

Bacterial pathogens and indicators in catfish and pond environments.

J. Food Prot., 1992, **55** (6) : 424-247.

LINTON R. H., WEBSTER J. B., PIERSON M. D., BISHOP J. R.,
HACKNEY C. R.

The effect of sublethal heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A.

J. Food Prot., 1992, **55** (2) : 84-87.

LITTLE C. L., ADAMS M. R., ANDERSON W. A., COLE M. B.

Application of a log-logistic model to describe the survival of *Yersinia enterocolitica* at sub-optimal pH and temperature.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **22** : 63-71.

LOESSNER M. J., BELL R. H., JAY J. M., SHELEF L. A.

Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria spp.*

Appl. Environ. Microbiol., 1988, **54** : 3003-3007.

LOVETT J, FRANCID D.W., HUNT J.M.

Listeria monocytogenes in raw milk : detection, incidence, and pathogenicity.

J. Food Prot.,1987, **50** : 188-192.

LOVETT J.

Listeria monocytogenes.

Chap 7 in "Foodborne bacterial pathogens". 1989.

DOYLE M. P. (Ed.), p 283-309. Marcel Dekker Inc. New York.

LOVETT J., FRANCIS D. W., PEELER J. T., TWEDT R. M.

Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from seafoods.

J. Food Prot., 1991, **54** (1) : 7-11.

MACKEY B. M., BOOGARD E., HAYES C. M., BARANYI J.

Recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **22** : 227-237.

MALLE P.

Le fumage à froid du saumon : aspects microbiologiques.

Thèse de l'Université des Sciences et Techniques de Lille. 1981.

MARTIN A., KATZ. S. E.

Rapid determination of *Listeria monocytogenes* in foods using a Resuscitation / Selection / Kit system Detection .

J. AOAC. Int., 1993, **76** (3) : 632-636.

Mc BRIDE M. E., GIRARD K. F.

A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations.

J. Lab. Clin. Med., 1960, **55** : 153-157.

Mc CLURE P. J., ROBERTS T. A., OGURU O.

Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium.

Let. Appl. Microbiol., 1989, **9** : 95-99.

Mc GOWAN A. P., BOWKER K., MC LAUHLIN J., BENNETT P. M.,

REEVES D. S.

The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria spp* in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **21** (4) : 325-334.

Mc LAUHLIN J.

Listeria monocytogenes recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in human.

J. Appl. Bacteriol., 1987, **63** : 1-11.

Mc MEEKIN T. A., CHANDLER R. E., DOE P. E., GARLAND C. D., OLLEY J.,
PUTRO S., RATKOWSKY D. A.

Model for the combined effect of temperature and water activity on the growth rate of
Staphylococcus xylosum.

J. Appl. Bacteriol., 1987, 62 : 543-550.

Mc MEEKIN T. A., OLLEY J. N., ROSS T., RATKOWSKY D. A.

Basic concepts and methods.

Chap 2 in " Predictive microbiology : theory and application". 1993, p : 11-86.

Research Studies Press LTD. John WILLEY & SONS INC.

MENDONCA A. F., KNABEL S. J.

A novel strictly anaerobic recovery and enrichment system incorporating lithium for
detection of heat-injured *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk containing background
microflora.

Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60 (11) : 4001-4008.

MESSINA M. C., AHMAD H. A., MARCHELLO J. A., GERBA C. P.,
PAQUETTE M. W.

The effect of liquid smoke on *Listeria monocytogenes* .

J. Food Prot., 1988, 51 (8) : 629-631.

MEYER M. D., DONNELLY C. W.

Effect of incubation temperature on repair of heat injured *Listeria* in milk.

J. Food Prot., 1992, 55 (8) : 579-582.

Microbial Identification System (MIS).

Operating manual version 4

Microbial ID, Inc. (MIDI) 115 Barksdale Professional Center

Newark, Delaware 19711 USA.

MILLET B.

Un meilleur contrôle du fumage : l'utilisation des condensats de fumées RED ARROW.

Matériels et Techniques. IAA. Novembre /Décembre 1994. pp 855-857.

MOY G., KÄFERSTEIN F., MOTARJEMI Y.

Application of HACCP to food manufacturing : some considerations on harmonization
through training.

Food Control, 1994, 5 : 131-139.

MOTES M. L.

Incidence of *Listeria spp* in shrimp, oysters and estuarine waters.

J. Food Microbiol., 1991, **54** (3) : 170-173.

MURRAY E. G. D., WEBB R. A., SWANN B. R.

A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.)

J. Pathol. Bacteriol., 1926, **29** : 407-439.

NIEDERHAUSER C., HÖFELEIN C., LÜTHY J., KAUFMANN U.,
BÜHLER H. P., CANDRIAN U.

Comparison of "GEN PROBE" DNA probe and PCR for detection of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated soft cheese and semi-soft cheese.

Res. Microbiol., 1993, **144** : 47-54.

NINET B., BANNERMAN E., BILLE J.

Assessment of the accuprobe *Listeria monocytogenes* culture identification reagent kit for rapid colony confirmation and its application in various enrichment broths.

Appl. Environ. Microbiol., 1992 a, **58** (12) : 4055-4059.

NINET B., TRAITLER H., AESCHLIMANN J. M., HORMAN I., HARTMANN D.,
BILLE J.

Quantitative analysis of cellular fatty acids (CFAs) composition of the seven species of *Listeria*.

System. Appl. Microbiol., 1992 b, **15** : 76-81.

NORRUNG B., SOLVE M., OVESEN M., SKOVGAARD N.

Evaluation of an ELISA test for detection of *Listeria spp*.

J. Food. Prot., 1991, **54** (10) : 752-755.

NOTERMANS S., INT' VELD P.

Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products.

Int. J. Food Microbiol., 1994, **24** : 33-39.

PALUMBO S. A., WILLIAMS A. C.

Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods.

Food Microbiol., 1991, **8**, 63-68.

PARANJPYE R. N., PELROY G. A., PETERSON M. E., POYSKY F. T.,
HOLLAND P. J., LASHBROOK L. C., EKLUND M. W.

Comparison of selective direct plating media for enumeration and recovery of
Listeria monocytogenes from cold-process (smoked) fish.

J. Food Prot., 1992, **55** (11) : 905-909.

PARTIS L., NEWTON K., MURBY J., WELLS R. J.

Inhibitory effects of enrichment media on the accuprobe test for *Listeria monocytogenes*.

Appl. Environ. Microbiol., 1994, **60** (5) : 1693-1694.

PETERSON M. E., PELROY G. A., PARANJPYE R.N., POYSKY F. T.,
ALMOND J. S., EKLUND M. W.

Parameters for control of *Listeria monocytogenes* in smoked fishery products : sodium
chloride and packaging method.

J. Food Prot., 1993, **56** (11) : 938-943.

PETTRAN L., ZOTTOLA E. A.

A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A.

J. Food Science, 1989, **54** (2) : 458-460.

PUTTMANN M., ADE N., HOF H.

Dependance of fatty acid composition of *Listeria spp.* on growth temperature.

Res. Microbiol., 1993, **144** : 279-283.

RATKOWSKY D. A., OLLEY J., Mc MEEKIN T. A., BALL A.

Relationship between temperature and growth rate of bacterial starter cultures.

J. Bacteriol., 1982, **149** : 1-5.

ROCOURT J.

The recognition and identification of *Listeria* species by classical methods.

Turkish Journal of Infection., 1988, **2** (4) : 471-485.

ROCOURT J.

Listeriose humaine : aspects cliniques et épidémiologiques. Rôle de l'alimentation.

Biologiste, 1989, **179** : 29- 40

ROCOURT J.

Listeria et listeriose humaine : la décennie 1979-1989.

Ann. Inst. Pasteur Actualités, 1990, **1** : 25-30.

ROCOURT J., GOULET V., LEPOUTRE A., DEHAUMONT P., VEIT P.

Epidémiologie de la listeriose.

Cahier Nutr. Diét., 1994, XXIX, 2 : 98-101.

ROCOURT J.

Impact économique des toxi-infections bactériennes d'origine alimentaire en Europe et en Amérique du nord.

Diplôme de 3ème cycle de Sciences Economiques et Sociales de la Santé.

Université Paris VII- Denis DIDEROT. Faculté de Médecine Lariboisière Saint-Louis. 1994.

RODRIGUEZ D. L., FERNANDEZ G. S., GARAYZABAL J. F. F., FERRI E. R.

New methodology for the isolation of *Listeria* microorganisms from heavily contaminated environments.

Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47 : 1188-1190.

RORVIK L. M., YNDESTAD M. , SKJERVE E.

Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4°C.

Int. J. Food Microbiol., 1991, 14 : 111-118.

RORVIK L. M., CAUGANT D. A., YNDESTAD M.

Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp* in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant.

Int. J. Food Microbiol., 1995, 25 : 19-27.

ROSS T., Mc MEEKIN T. A;

Predictive microbiology.

Int. J. Food Microbiol., 1994, 23 : 241-264.

RYSER E. T., MARTH E .H.

Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*.

Chap 6 in "*Listeria* listeriosis and food safety"., 1991a, p : 120-193.

Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong.

RYSER E.T., MARTH E .H.

Rapid methods to detect *Listeria monocytogenes* in food and environmental samples.

Chap 7 in "*Listeria* listeriosis and food safety"., 1991b, p : 194-239.

Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong.

RYSER E. T., MARTH E .H.

Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products.

Chap 9 in "*Listeria* listeriosis and food safety"., 1991c, p : 288- 330.

Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong.

RYSER E.T., MARTH E .H.

Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in fish and seafood.

Chap 13 in "*Listeria* listeriosis and food safety"., 1991d, p : 496-512.

Marcel Dekker, Inc., New York. Basel. Hong Kong.

SAINCLIVIER M.

L'industrie alimentaire halieutique. Vol 1 : le poisson matière première.

Bull. Sci. Tech. de l'Ecole Nationale Agronomique et du Centre de Recherche de Rennes. 1983.

SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B., BROOME C. V.

Epidemiology of human listeriosis.

Clin. Microbiol. Rev., 1991, **4** (2) : 169-183.

SEELIGER H. P. R.

Reviews. New outlook on the epidemiology and epizootology of listeriosis.

Acta. Microbiol. Hung., 1972, **19** : 273-286.

SEELIGER H. R. P.

Serovars of *Listeria monocytogenes* and others *Listeria* species.

In "Problems of Listeriosis". 1975.

Wood Bine (Ed). Leicester University Press. Leicester.

SHAHAMAT M., SEAMAN A., WOODBINE M.

Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentration.

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.A., 1980, **246** : 506-511.

SHIMASAKI T., MIAKE K., TSUKAMASA Y., SUGIYAMA M., MINEGISHI Y., SHINANO H.

Effect of water activity and storage temperature on the quality and microflora of smoked salmon.

Nippon Suisan Gakkaishi., 1994, **60** (5) : 596-576.

SKINNER G. E., LARKIN J. W., RHODEHAMEL E. J.

Mathematical modeling of microbial growth : a review.

J. Food Safety., 1994, **14** (3) : 175-217.

SKOVGAARD N.

Listeria : Ecology in the food chain.

Acta Microbiol. Hung., 1989, **36** (2-3) : 239-243.

SLADE P. J.

Monitoring *Listeria* in the food production environment.I. Détection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology.

Food Res. Int., 1992, **25** : 45-56.

SMITH C. W., METZGER J. F.

Demonstration of a capsular structure on *Listeria monocytogenes*.

Pathol. Microbiol., 1962, **25** : 499-506.

SOKOLOVIC Z., RIEDEL J., WUENSCHER M., GOEBEL W.

Surface-associated, Prf A regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions.

Mol. Microbiol., 1993, **8** (2) : 219-227.

SOUSSANA.

Fumage.

Encyclopédie de la charcuterie, 1990, 334 - 339.

TABOURET M., DE RYCKE J., AUDURIER A., POUTREL B.

Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listerolysin production.

J. Med. Microbiol., 1991, **34** : 13-18.

TILNEY L. G., TILNEY S. M.

The wily ways of a parasite : induction of actin assembly by *Listeria* .

Trends in Microbiol., 1993, **1** (1) : 25-31.

URL B., HEITZER A., BRANDL E.

Determination of *Listeria* in dairy and environmental samples : comparison of a cultural method and colorimetric nucleic acid hybridization assay.

J. Food Prot., 1993, **56** (7) : 584-592.

VAN. NETTEN P., VAN de VEN A., PERALES I., MOSSEL D. A. A.

A selective and diagnostic medium for use in the enumeration of *Listeria spp* in foods.

Int. J. Food Microbiol., 1988, **6** : 187-198.

VAN NETTEN P., PERALAES I., CURTIS G. D. W., MOSSEL D. A. A.

Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp*.

Int. J. Food Microbiol., 1989, **8** : 299-316.

VARNAM A. H., EVANS. M. G.

Listeria monocytogenes.

Chap 16 in "Foodborne pathogens. An illustrated text "., 1991, p 327-353.

Wolfe Publishing Ltd.

VASQUEZ J. A., DOMINGUEZ L., FERNANDEZ J. F., RODRIGUEZ-FERRI E. F., BRIONES V., BLANCO M., SUAREZ G.

Revision of the validity of CAMP tests for *Listeria* identification. Proposal of an alternative method for the determination of hemolytic activity by *Listeria* strains.

Acta. Microbiol. Hung., 1990, **37** (2) : 201-206.

WALKER S. J, ARCHER P., BANKS J. G.

Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures.

J. Appl. Bacteriol., 1990, **68** : 157-162.

WARBURTON D. W., FARBER J. M., POWELL C., TIWARI N. P., READ S., PLANTE R., BABIUK T., LAFFEY P., KAURI T., MAYERS P., CHAMPAGNE M. J., HUNT T., La CASSE P., VIET K., SMANDO R., COASTE F.

Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*.

Food Microbiol., 1992, **9** : 127-145.

WEAGANT S.D., SADO P.N., COLBURN K.G., TORKELSON J.D., STANLEY F.A., KRANE M.H., SHIELDS S.C., THAYER C.F.

The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products.

J. Food Prot., 1988, **51** (8), 655-657.

WELCH D. F.

Applications of cellular fatty acid analysis.

Clin. Microbiol. Rev., 1991, **4** (4) : 422-438.

WENDORFF W. L., RIHA W. E., MUEHLENKAMP E.

Growth of molds on cheese treated with heat or liquid smoke.

J. Food Prot., 1993, **56** (11) : 963-966.

WHITING R. C., BUCHANAN R. L.

Microbial modeling.

Food Tech., 1994, **48** (6) : 113-120.

WIJZES T., Mc CLURE P. J., ZWIETERING M. H., ROBERTS T. A.

Modelling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature.

Int. J. Food Microbiol., 1993, **18** : 139-149.

WOLCOTT M. J.

DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens.

J. Food Prot., 1991, **54** (5) : 387-401.

ZWIETERING M. H., JONGENBURGER I., ROMBOUITS F. M., VANT RIET K.

Modeling of bacterial growth curve.

Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56** (6) : 1875-1881.

ANNEXES

Bouillon LEB

Formule en g/l:

-Peptone de caséine	17,0
-Peptone de farine de soja	3,0
-D(+) Glucose	2,5
-Chlorure de sodium	5,0
-Dihydrogénophosphate de sodium	2,5
-Extrait de levure	6,0

pH=7,3 +/- 0,1

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base:

- 10 mg d'acriflavine
- 40 mg d'acide nalidixique
- 50 mg de cycloheximide

Bouillon UVM

(Bouillon d'enrichissement)

Formule en g/l:

-Protéose	5
-Tryptone	5
-Extrait de viande de boeuf	5
-Extrait de levure	5
-Chlorure de sodium	20
-Phosphate disodique	12
-Dihydrogenophosphate de K	1,35
-Esculine	1

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base:

UVM I (OXOID SR 142 B)

- 12 mg d'acriflavine
- 20 mg d'acide nalidixique

UVM II (OXOID SR 143 B)

- 25 mg d'acriflavine
- 20 mg d'acide nalidixique

FRASER

(Bouillon d'enrichissement)

Formule en g/l:

-Protéose peptone	5
-Tryptone	5
-Extrait de viande de boeuf	5
-Extrait de levure	5
-Chlorure de sodium	20
-Phosphate dissodique	12
-Dihydrogénophosphate de potassium	1,35
-Esculine	1

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base:

- 20 mg d'acide nalidixique
- 25 mg d'acriflavine
- 0,5 g de citrate ferrique ammoniacal
- 3 g de chlorure de lithium

FRASER 1 / 2
(Bouillon d'enrichissement)

Formule en g/l:

-Protéose peptone	5
-Tryptone	5
-Extrait de viande de boeuf	5
-Extrait de levure	5
-Chlorure de sodium	20
-Phosphate dissodique	12
-Dihydrogénophosphate de potassium	1,35
-Esculine	1

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base:

- 10 mg d'acide nalidixique
- 12 mg d'acriflavine
- 0,5 g de citrate ferrique ammoniacal
- 3 g de chlorure de lithium

Gélose T.S.A.
(Gélose Trypto-caséine -soja)

Formule en g/l:

-Hydrolysats tryptique de caséine	15
-Peptone de soja	5
-Chlorure de sodium	5
-Agar	15

pH= 7,3 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Gélose PALCAM

(Base Placam + Polymyxine B-Ceftazidime- Acriflavine)

Formule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Glucose	0,5
-Esculine	0,8
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Mannitol	10
-Rouge de phénol	0,08
-Chlorure de lithium	15
-Agar	13

pH= 7,2+/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base:

- 10 mg de polymyxine B
- 5 mg d'acriflavine
- 20 mg de ceftazidime

Gélose OXFORD

**(Base Oxford+ Cycloheximide- Colistine-Acriflavine-Cefotetan-
Fosfomycine)**

Formule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Esculine	1
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Chlorure de lithium	15
-Agar	13

pH=7,2 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Ajouter aseptiquement à un litre de base le contenu de deux flacons de supplément SRI 40E reconstitué avec 5 ml d'éthanol/eau distillée stérile à parties égales

Composition dun flacon de supplément SRI40E:

- 200 mg de cycloheximide
- 10 mg de colistine (Sigma)
- 2,5 mg d'acriflavine
- 1 mg de cefotetan
- 5 mg de fosfomycine

Tampon Phosphate Salin (PBS Solution x 10)

Formule en g/l:

-Na ₂ HPO ₄ (anhydre)	12
-NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,2
-NaCl	85
-Eau distillée QSP	1 litre

Autoclaver 15 minutes à 121°C

Diluez la solution stock 1 : 9 avec de l'eau distillée.
Mélanger.

Ajuster à pH 7,5 avec NaOH 0,1 N ou HCl 0,1 N

