

N°:1561

# THESE

présentée à

**L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES  
DE LILLE**

pour le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE**

Spécialité: Sciences de la Vie et de la Santé

Option : Microbiologie

par

**KABA Ibrahima**

**Développement d'une Méthodologie  
Rapide de Recherche de *Listeria* par  
Impédancemétrie dans l'Environnement  
des Industries Agro-Alimentaires**

Soutenue devant la commission d'examen le 26 Juin 1995

Président : Pr. J. P. Hornez

Rapporteurs: Dr. A. Pauss

Dr. J. Rocourt

Membres: Pr. D. A. A. Mossel

Dr. J. L. Tholozan



# DEDICACE

A la mémoire de mon père.

A ma mère pour toute l'admiration que j'ai pour toi.

A toute ma famille et à Sarah CHAUDESAIGUES pour m'avoir toujours soutenu même dans les moments difficiles.

# REMERCIEMENTS

## Présentation du Laboratoire d'accueil

Ce travail a été réalisé à l'Institut Pasteur de Lille au sein du Service de Microbiologie et d'Hygiène des Aliments (SERMHA) installé sur le domaine du CERTIA à Villeneuve d'Ascq. Ce service dispose d'un laboratoire moderne accrédité par le Réseau National d'Essais RNE (COFRAC) et d'un réseau national de correspondants lui permettant d'être géographiquement présent dans de nombreuses régions en France. Sa principale activité est l'analyse de produits alimentaires selon des méthodes normalisées (AFNOR, ISO, FIL), des méthodes officielles ou encore celles recommandées dans des cahiers de charges très spécifiques. A côté de cette prestation de service, le SERMHA fait des audits en entreprise et du conseil en laboratoire grâce à ses qualitatifs. Des cours de mise à niveau sont régulièrement organisés par son département des enseignements.

Le département de recherche et développement où les expériences ont été effectuées dispose de nombreux matériels sophistiqués [Impédancemétrie, ATPmétrie, Cytométrie de flux, Chromatographie Phase Gaz, Bioscreen, DEFT, Vidas...]. D'autres matériels sont en cours d'installation [exemple de la PCR].

## Remerciements

L'aboutissement de ce travail me donne l'occasion d'exprimer ma gratitude à tous ceux qui ont permis sa réalisation.

**Monsieur Michel Catteau** Directeur du SERMHA, par votre esprit d'ouverture et votre souci de divulguer l'information scientifique, vous m'avez donné la chance de travailler sur la technique de l'impédancemétrie alors que je me trouvais encore à l'Institut Pasteur d'Abidjan. Les débuts ont été difficiles mais grâce à votre précieuse contribution et votre patience, les travaux ont pu être réalisés. J'ai bénéficié de votre sollicitude et de votre disponibilité à chaque fois que besoin en était. Vous m'avez toujours fait confiance et n'hésitez pas à me recommander auprès de vos connaissances. Vos qualités humaines m'encouragent à penser que vous voudrez bien recevoir d'autres étudiants de Côte d'Ivoire afin qu'ils réalisent leur formation dans votre laboratoire. Que ce travail me permette de vous exprimer le témoignage de ma gratitude.

**Docteur Dosso Bretin Mireille**, vous avez initié mes pas à la microbiologie à l'Institut Pasteur d'Abidjan puis favorisé et encouragé ma formation dans cette discipline à l'Institut Pasteur de Lille. J'ai toujours eu auprès de vous un accueil chaleureux et des conseils judicieux. J'espère profiter encore de la pertinence de votre esprit scientifique et de votre passion pour la recherche. Ces qualités sont pour moi un exemple que je serai heureux de pouvoir suivre. Qu'il me soit permis de vous dire du fond du coeur: Merci.

**Professeur J. P. Hornez**, vous avez pris la responsabilité d'être mon Directeur de thèse et à ce titre j'ai bénéficié de vos nombreux conseils. Votre immense compétence m'a été d'un grand atout dans la réalisation de ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

**Docteur Jocelyne Rocourt**, vos multiples interventions sur les problèmes posés par *Listeria* spp. notamment *L. monocytogenes* vous valent une renommée internationale. C'est un grand honneur pour moi que vous ayez acceptée spontanément et ce malgré un emploi du temps chargé, non seulement de participer au jury de ma thèse mais également de prendre la responsabilité d'être rapporteur. Je tiens à vous dire toute ma reconnaissance.

**Professeur D. A. A. Mossel**, vous m'avez donné l'occasion de me présenter au concours du prix de la fondation EIJKMAN pour lequel le conseil d'administration m'a sélectionné. Malgré le peu de temps libre que vous laissent vos charges nationales et internationales, vous avez accepté de participer à ce jury. Par ces actes, vous montrez l'intérêt que vous portez à mes travaux. Soyez assuré que je mesure le prix de votre présence dans ce jury et vous prie d'accepter l'expression de ma profonde et respectueuse gratitude.

**Docteur André Pauss**, c'est avec gentillesse et une grande courtoisie que vous m'avez accueilli à l'Université Technologique de Compiègne. Le temps passé dans votre service m'a permis d'apprécier vos qualités humaines et la facilité avec laquelle vous établissez des contacts avec les étudiants. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

**Docteur Jean Luc Tholozan**, en acceptant de participer au jury de cette thèse, vous confirmez l'intérêt que vous avez toujours eu pour mes travaux. Permettez-moi de vous exprimer mes respectueux remerciements.

Je tiens enfin à exprimer ma sympathie à tous les membres du SERMHA pour l'accueil aimable reçu pendant mon stage. J'ai éprouvé beaucoup de plaisir pendant les trois années passées dans vos locaux. Que tous ceux qui m'ont aidé trouvent ici l'expression de ma gratitude.

# AVANT PROPOS

Les principes de base de l'impédancemétrie appliquée en biologie sont connus depuis 1900, mais les limites des appareils utilisés ne permettaient pas une diffusion suffisante et une utilisation facile en routine. Ainsi jusqu'en 1970, très peu de travaux ont été effectués sur l'utilisation de cette technique pour la détection des microorganismes. Mais l'intérêt pour l'impédancemétrie s'est accru à partir de cette date grâce à l'apparition d'appareils pouvant analyser simultanément jusqu'à 32 échantillons.

L'application de cette technique s'est multipliée aussi bien dans le domaine médical qu'en alimentaire avec la publication de de nombreux travaux. L'essentiel concernent le dénombrement de la flore totale. La détection des flores particulières rencontre quelques difficultés. Des milieux spécifiques existent actuellement pour rechercher les salmonelles, les levures et les moisissures, les coliformes, *E. coli*, les enterocoques, ...

L'implication de *Listeria monocytogenes* dans des infections d'origine alimentaire a démontré le plus souvent, le rôle joué par l'environnement notamment dans les contaminations post-process. Les méthodes traditionnelles de contrôle microbiologique étant longues et fastidieuses, nous nous proposons de mettre au point une méthode rapide basée sur le principe de l'impédancemétrie pour détecter *Listeria*. Elle doit présenter les avantages d'un outil pouvant servir dans la mise en place de système HACCP qui constitue selon l'OMS, le meilleur moyen de prévenir le danger *Listeria*.

Cette étude comportera deux parties essentielles:

- 1-Mise au point d'une méthode impédancemétrique de détection de *Listeria* dans les échantillons d'environnement.
- 2-Application de la méthode dans différentes industries alimentaires et comparaison avec la méthode de référence AFNOR V08 055.

## RESUME:

Le milieu Oxford sans chlorure de lithium supplémenté avec la ceftazidime et la proflavine est adapté à la détection de *Listeria* par la mesure de la capacitance. Le pH optimal se situe à  $6,5 \pm 0,5$ . Les délais de détection sont réduits en présence de l'oxyrase. Un signal typique est obtenu dans le cas de *Listeria* tandis que la flore indésirable est inhibée, leur signal se traduisant par une courbe plate.

248 échantillons prélevés dans l'environnement de 6 industries alimentaires et d'un hypermarché ont été analysés simultanément par la méthode de référence AFNOR V08 055 et par celle de l'impédancemétrie. 50 échantillons contenaient *Listeria* par les deux méthodes cumulées soit 20% de positifs. Parmi les espèces identifiées on note dans l'ordre des fréquences: *L. monocytogenes* 50%, *L. innocua* 37%, *L. seeligeri* 7% et *L. welshimeri* 6%. La méthode de référence a permis de mettre en évidence 48 positifs avec une durée moyenne d'analyse égale à 7 jours. L'impédancemétrie a détecté *Listeria* dans 47 échantillons au bout de 48 heures sans aucun faux positif.

La sensibilité de chacune des deux méthodes est de 100%. Par contre, la spécificité de la méthode AFNOR V08 055 est de 98% alors qu'elle est de 94% pour l'impédancemétrie. La différence des résultats est statistiquement non significative ( $p < 0,01$ ).

L'étude de l'évolution logarithmique des ratios des formes isomériques Iso et Antéiso des acides gras membranaires C17 et C15 obtenus en CPG (Chromatographie Phase Gaz), ainsi que les regroupements obtenus par les programmes 2D-Plot et Dendrogram permettent de caractériser les souches de *Listeria* isolées.

La méthode impédancemétrique développée est rapide et économique. Elle peut servir d'alternative à la méthode de référence AFNOR V08 055 et peut être appliquée dans les systèmes de qualité HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) pour le contrôle des contaminations par *Listeria*.

Mots clés: *Listeria*, Impédancemétrie, Rapide, Environnement, Industrie Alimentaire, CPG.

## ABSTRACT

The Oxford broth without lithium chloride supplemented with ceftazidime and proflavine is adapted to the detection of *Listeria* by the measure of capacitance. The optimal pH is at  $6,5 \pm 0,5$ . The times of detection are reduced when oxyrase is used in the broth. Concerning *Listeria*, a typical signal is obtained whereas the background flora is inhibited, their signal being flat.

248 samples collected from the environment of 6 food industries and from a supermarket have been analysed simultaneously with the reference method AFNOR V08 055 and with the Impedimetric method. 50 samples yielded *Listeria* by both methods together which represents 20% of positive results. Among the identified species, it was noted in frequencies in the following order: *L. monocytogenes* 50%, *L. innocua* 37%, *L. seeligeri* 7% and *L. welshimeri* 6%. The reference method allowed to reveal 48 positive results within an average time of analysis equal to 7 days. The Impedimetric method detected *Listeria* within 48 hours without false positive results.

The sensibility of both methods is equal to 100%. But the specificity of AFNOR V08 055 method is equal to 98% whereas for the Impedimetric method, it is equal to 94%. The difference between the overall results is statistically non significant ( $p < 0,01$ ).

The study of the evolution of logarithmic values for the isomeric forms Iso and Anteiso of cellular fatty acids C15 and C17 obtained with the Gas-Liquid Chromatographic analysis, as well as the clusters obtained with 2D-Plot and Dendrogram allowed to characterize strains of *Listeria* isolated.

The impedimetric method developed is rapid and economical. It can be an alternative to the reference method AFNOR V08 055 and can be used in the systems of quality HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) to control contaminations by *Listeria*.

Key-words: *Listeria*, Impedimetry, Rapid, Environment, Food Industry, GLC.

# LISTES DES PUBLICATIONS SE RAPPORTANT A CE TRAVAIL

## ARTICLES

1- **Kaba, I.**, Catteau, M. and Hornez, J. P. A selective impedimetric detection of *Listeria* spp. (Soumise à Food Microbiology).

2- **Kaba, I.**, Catteau, M. and Hornez, J. P. Comparison of impedimetric and traditional plating method AFNOR V08 055 for detecting *Listeria* spp. in food processing environments. (Soumise à Applied and Environmental Microbiology)

3- **Kaba, I.**, Catteau, M. and Hornez, J. P. Investigation of some microorganisms as indicator of *Listeria* spp. in food industrial environment. (Soumise à International Journal of Food Microbiology)

## COMMUNICATIONS

1- **Kaba, I.**, Dengremont, E., Joly, I. et Catteau, M. Recherche de *Listeria* dans les produits carnés par impédancemétrie. (Société Française de Microbiologie, Paris 1993)

2- **Kaba, I.**, Vincent, J. P., Catteau, M. et Hornez, J. P. Application de l'impédancemétrie à la recherche de *Listeria* dans l'environnement des industries agro-alimentaires. (Société Française de Microbiologie, Dijon 1994)

# TABLE DES MATIERES

**INTRODUCTION** page 2

**I- GENERALITES** page 5

**I-1 GENERALITES SUR *LISTERIA*** page 5

**I-1 1 TAXONOMIE** page 5

**I- 1 2 MARQUEURS PHENOTYPIQUES** page 5

**I-1 3 CARACTERES CULTURAUX** page 6

**I-1 4 TYPAGES MOLECULAIRES** page 8

**I-1 5 PATHOGENICITE-VIRULENCE** page 9

**I-1 6 ECOLOGIE DE *LISTERIA*** page 10

**I-1 7 LES TRAITEMENTS NATURELS ANTI-*LISTERIA*** page 10

**I-1 8 LES TRAITEMENTS PHYSIQUES ANTI-*LISTERIA*** page 12

**I-1 9 LES CRITERES** page 12

**I-1 10 LES METHODES OFFICIELLES DE RECHERCHE  
DE *LISTERIA*** page 13

**I-2 GENERALITES SUR L'IMPEDANCEMETRIE** page 14

**I-2 1 HISTORIQUE DE LA MESURE DE L'IMPEDANCE** page 14

**I-2 2 THEORIE DE L'IMPEDANCEMETRIE DIRECTE** page 16

**I-2 3 THEORIE DE L'IMPEDANCEMETRIE INDIRECTE** page 18

**I-2 4 CHOIX DU PARAMETRE DE MESURE** page 18

**I-2 5 BASES DE LA MESURE DE LA CAPACITANCE** page 19

**I-2 6 APPAREILLAGE** page 20

<b>II- MATERIELS ET METHODES</b>	page 21
<b>II-1 LES MATERIELS</b>	page 21
<b>II-1 1 LES MICROORGANISMES ANALYSES</b>	page 21
II-1 1 1 Préparation des cultures pures pour l'impédance	page 21
II-1 1 2 Préparation des cultures pures pour la CPG	page 21
II-1 1 3 Préparation des cultures mixtes	page 26
II-1 1 4 Ensemencement des modules de capacitance	page 26
II-1 1 5 Ensemencement des modules de conductance	page 26
II-1 1 6 Les dénombrements microbiens	page 27
<b>II-1 2 LES MILIEUX DE CULTURE</b>	page 28
<b>II-1 3 LES APPAREILS UTILISES</b>	page 28
II-1 3 1 L'ensemenceur spiral	page 28
II-1 3 2 Le Bactometer	page 28
II-1 3 3 Le Rabit	page 30
II-1 3 4 Le Chromatographe HPLC	page 31
II-1 3 5 Le Chromatographe CPG	page 31
<b>II-2 LES METHODES</b>	page 32
<b>II-2 1 FORMULATION DU MILIEU</b>	page 32
II-2 1 1 La base	page 32
II-2 1 2 Le supplément sélectif	page 33
<b>II-2 2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION</b>	page 36
II-2 2 1 Rôle du fer dans le milieu de base	page 36
II-2 2 2 Le pH initial du milieu	page 36
II-2 2 3 Origine des variations de capacitance	page 37
II-2 2 4 Détection de <i>Listeria</i> en conductance	page 39
II-2 2 5 Détection de <i>Listeria</i> en présence d'oxyrase	page 39

II-2 2 6 Calcul des temps de génération de <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115 dans les milieux LEB, UVMI et FRASER 1/2	page 39
II-2 2 7 Seuil de détection et détermination du temps d'enrichissement des échantillons à analyser	page 40
II- 2 3 VALIDATION DE LA METHODE MISE AU POINT	page 41
II-2 3 1 Sur les cultures pures	page 41
II-2 3 2 Sur les cultures mixtes	page 41
II-2 3 3 Sur les prélèvements d'environnement	page 41
a) Méthode de prélèvement des échantillons	page 41
b) Recherche de <i>Listeria</i> par la méthode AFNOR V08 055	page 42
c) Recherche de <i>Listeria</i> par impédancemétrie	page 42
II-2 4 LES METHODES D'IDENTIFICATION DE <i>LISTERIA</i>	page 45
II-2 4 1 Par les tests biochimiques	page 45
II-2 4 2 Par la Chromatographie Phase Gazeuse	page 45
II- 2 5 LES TRAITEMENTS STATISTIQUES	page 47
 <b>III LES RESULTATS</b>	page 49
 <b>III-1 ETAPES DE SELECTION D'UN MILIEU APPROPRIE</b>	page 49
III- 1 1 LES MILIEUX COMPLETS	page 49
III-1 2 LES MILIEUX SANS LEUR SUPPLEMENT SELECTIF	page 49
III-1 3 LES MILIEUX DE BASE SANS CHLORURE DE LITHIUM	page 52
III-1 4 FORMULATION DU SUPPLEMENT SELECTIF	page 56
 <b>III-2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION</b>	page 59
III-2 1 ROLE DU FER DANS LE MILIEU	page 59
III-2 2 DETERMINATION DU pH OPTIMAL DU MILIEU	page 64
III-2 3 ORIGINE DES VARIATIONS DE CAPACITANCE	page 68

<b>III-2 4 CARACTERISTIQUES DU SIGNAL DE <i>LISTERIA</i> EN CONDUCTANCE DIRECTE ET INDIRECTE</b>	page 68
<b>III-2 4 1 Milieu Pasteur</b>	page 70
<b>III-2 4 2 Milieu AES</b>	page 70
<b>III-2 5 DETECTION DE <i>LISTERIA</i> EN PRESENCE D'OXYRASE</b>	page 70
<b>III-2 6 TEMPS DE GENERATION DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> 4b 19115 DANS LES MILIEUX LEB, UVM1 ET FRASER 1/2</b>	page 74
<b>III-2 7 SEUIL DE DETECTION DE <i>LISTERIA</i> ET DUREE D'ENRICHISSEMENT DES ECHANTILLONS</b>	page 76
<b>III-3 VALIDATION DE LA METHODE MISE AU POINT</b>	page 77
<b>III-3 1 SPECIFICITE ET SELECTIVITE DU MILIEU</b>	page 77
<b>III-3 2 RECHERCHE DE <i>LISTERIA</i> DANS L'ENVIRONNEMENT</b>	page 80
<b>III-3 2 1 Par la méthode AFNOR V08 055</b>	page 80
<b>III-3 2 2 Par la méthode impédancemétrique</b>	page 85
<b>III-4 CARACTERISATION DE <i>LISTERIA</i> PAR LA CPG</b>	page 88
<b>III-5 LES INDICATEURS DE LA PRESENCE DE <i>LISTERIA</i></b>	page 96
 <b>IV DISCUSSION</b>	 page 101
<b>IV-1 MILIEU SELECTIF IMPEDANCEMETRIQUE</b>	page 101
<b>IV-1 1 SELECTION DE LA BASE</b>	page 101
<b>IV-1 2 ROLE DU FER</b>	page 104
<b>IV-1 3 FORMULATION DU SUPPLEMENT SELECTIF</b>	page 105

<b>IV-2 CONDITIONS DE DETECTION DE <i>LISTERIA</i></b>	page 106
IV-2 1 LE pH INITIAL DU MILIEU	page 106
IV-2 2 ORIGINE DE LA VARIATION DE CAPACITANCE	page 107
IV-2 3 DETECTION DE <i>LISTERIA</i> EN CONDUCTANCE DIRECTE ET INDIRECTE	page 108
IV-2 4 EFFETS DE L'OXYRASE	page 109
IV-2 5 SEUIL DE DETECTION DE <i>LISTERIA</i>	page 110
<b>IV-3 VALIDATION DE LA METHODE MISE AU POINT</b>	page 111
IV-3 1 LA METHODE AFNOR V08 055	page 111
IV-3 2 COMPARAISON DES METHODES AFNOR V08 055 ET IMPEDANCEMETRIQUE	page 114
<b>IV- 4 CARACTERISATION DE <i>LISTERIA</i> PAR LA CPG</b>	page 116
<b>IV-5 LES INDICATEURS DE <i>LISTERIA</i></b>	page 118
<b>V CONCLUSION &amp; PERSPECTIVES</b>	page 120
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## **ANNEXES**

# LISTE DES ILLUSTRATIONS

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1: Schéma des processus énergétiques des bactéries hétérotrophes en aérobiose (d'après Marchal et coll., 1987). page 6
- Figure 2: Schéma représentant le modèle du système impédancemétrique. page 16
- Figure 3: Présentation du Bactometer M123 et incubation d'un module ensemencé. page 28
- Figure 4: Protocole AFNOR V08 055 utilisé pour la recherche de *Listeria*. page 42
- Figure 5: Protocole utilisé pour la recherche de *Listeria* par impédancemétrie. page 43
- Figure 6: Courbes d'évolution de *L. monocytogenes* 4b 88/7137 dans différentes bases sans leur supplément sélectif. page 52
- Figure 7: Courbes d'évolution de *L. innocua* 6b 87/7137 dans différentes bases sans leur supplément sélectif. page 52
- Figure 8: Courbes d'évolution de *L. monocytogenes* 4b 19115 dans différentes bases sans LiCl. page 54
- Figure 9: Courbes d'évolution de *L. welshimeri* 987 dans différentes bases sans LiCl. page 54
- Figure 10: Signal des bactéries détectées dans le milieu Oxford sans LiCl additionné de Nitrofurantoïne 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l. page 60
- Figure 11: Signal de *E. faecalis* dans le mélange témoin sans *Listeria* en culture dans le milieu Oxford sans LiCl en présence d'antibiotiques (Proflavine 21mg/l + Ceftazidime 20mg/l et Nitrofurantoïne 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l). page 60
- Figure 12: Détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en impédancemétrie dans le milieu Témoin sans fer et dans l'essai avec du fer:  $C_6H_5O_7Fe(NH_4)_2$ . page 62
- Figure 13: Détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en impédancemétrie dans le milieu contenant du fer:  $Fe(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4, 24H_2O$  et  $Fe(SO_4), 7H_2O$ . page 62
- Figure 14: Les courbes de capacitance de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction de différents pH du milieu. page 65
- Figure 15: Les courbes de conductance de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction de différents pH du milieu. page 65
- Figure 16: Variation des temps de détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction du pH initial du milieu. page 66
- Figure 17: Répétabilité du temps de détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction du pH initial du milieu. page 66
- Figure 18: Types de composés organiques formés au cours des différentes étapes de détection de *Listeria* en impédancemétrie (phase 1, phase 2. page 68

Figure 19: Types de composés organiques formés au cours des différentes étapes de détection de <i>Listeria</i> en impédancemétrie (phase 3, phase 4, phase 5).	page 68
Figure 20: Evolution des courbes de conductance directe de <i>Listeria</i> en culture dans le milieu Pasteur. 1, 2, 3: Essais et 4: Témoin milieu.	page 69
Figure 21: Evolution des courbes de conductance indirecte de <i>Listeria</i> en culture dans le milieu Pasteur. 1, 2, 3: Essais et 4: Témoin milieu.	page 69
Figure 22: Evolution des courbes de conductance directe de <i>Listeria</i> en culture dans le milieu AES. 1: Témoin milieu et 2, 3, 4, 5: Essais.	page 71
Figure 23: Droite de régression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu FRASER AU 1/2.	page 73
Figure 24: Droite de régression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu UVMI.	page 73
Figure 25: Droite de régression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu LEB.	page 73
Figure 26: Signal typique de <i>Listeria</i> en impédancemétrie.	page 80
Figure 27: Signal typique de <i>Listeria</i> en impédancemétrie en présence de cultures mixtes.	page 80
Figure 28: Répartition des échantillons positifs en <i>Listeria</i> en fonction de leur nature.	page 84
Figure 29: Signal non typique des microorganismes résistants à la sélectivité du milieu impédancemétrique (Essai 1, Essai 2).	page 85
Figure 30: Signal non typique des microorganismes résistants à la sélectivité du milieu impédancemétrique (Essai 1, Essai 2).	page 85
Figure 31: Evolution du logarithme des ratios des formes isomériques des acides gras C17 et C15.	page 91
Figure 32: Regroupement des souches de <i>Listeria</i> d'environnement à l'aide du programme Dendrogram.	page 92
Figure 33: Formation des clusters avec des souches de <i>Listeria</i> d'environnement à l'aide du programme 2D-Plot.	page 93
Figure 34: Répartition des fréquences absolues des indicateurs en fonction de la charge des échantillons examinés.	page 96
Figure 35: Fréquence d'isolement de <i>Listeria</i> en fonction de la charge des indicateurs.	page 96

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les souches de <i>L. monocytogenes</i> utilisées pendant les essais.	page 21
Tableau 2: Les autres espèces de <i>Listeria</i> utilisées pendant les essais.	page 22
Tableau 3: Flore associée utilisée pendant les essais.	page 23
Tableau 4: Les souches de <i>Listeria</i> isolées dans l'environnement industriel et analysées par la CPG.	page 24
Tableau 5: Les facteurs étudiés dans le plan d'expériences et leurs références bibliographiques.	page 33
Tableau 6: Variation du pH des milieux sélectifs Oxford sans chlorure de lithium en fonction des volumes de NaOH ou HCl ajoutés.	page 37
Tableau 7: Détection de <i>Listeria</i> dans les milieux additionnés de leur supplément sélectif.	page 49
Tableau 8: Pourcentages de variation de capacitance des milieux contenant leur supplément sélectif en présence de <i>Listeria</i> .	page 49
Tableau 9: Détection de <i>Listeria</i> dans les milieux sans leur supplément sélectif.	page 50
Tableau 10: Pourcentages de variation de capacitance des milieux sans leur supplément sélectif en présence de <i>Listeria</i> .	page 50
Tableau 11: Détection de <i>Listeria</i> dans les milieux liquides sans LiCl.	page 53
Tableau 12: Pourcentages de variation de capacitance des milieux liquides sans LiCl en présence de <i>Listeria</i> .	page 53
Tableau 13: Matrice d'expériences et Matrice des effets appliquées à <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115.	page 56
Tableau 14: Matrice d'expériences et Matrice des effets appliquées à <i>E. faecalis</i> 210867.	page 57
Tableau 15: Temps de détection des bactéries testées en présence de deux combinaisons d'antibiotiques dégagées par le plan d'expériences.	page 59
Tableau 16: Importance du fer dans le milieu impédancemétrique sur la détection de <i>L. monocytogenes</i> 4b 19115.	page 61
Tableau 17: Variation de la capacitance et de la conductance en fonction du pH initial du milieu sélectif Oxford sans LiCl.	page 64
Tableau 18: Temps de détection en heures de <i>Listeria</i> en présence et en absence d'oxyrase par impédancemétrie.	page 72
Tableau 19: Détection des espèces de <i>L. monocytogenes</i> par impédancemétrie en culture pure dans le milieu sélectif formulé.	page 76
Tableau 20: Détection des autres espèces de <i>Listeria</i> par impédancemétrie en culture pure dans le milieu sélectif formulé.	page 77
Tableau 21: Détection de la flore de contamination en absence ou en présence de <i>Listeria</i> dans le milieu sélectif formulé.	page 79

Tableau 22: Répartition des fréquences des espèces de <i>Listeria</i> isolées des prélèvements d'environnement.	page 81
Tableau 23: Nature et origine des échantillons contaminés par <i>Listeria</i> .	page 82
Tableau 24: Comparaison des résultats bruts des méthodes AFNOR V08 055 et impédancemétrique.	page 87
Tableau 25: Identification de <i>Listeria</i> en chromatographie phase gaz.	page 87
Tableau 26: Proportions des différents types d'acides gras rencontrés chez <i>Listeria</i> .	page 88
Tableau 27: Proportion de chaque pic identifié chez les espèces de <i>Listeria</i> testées.	page 89
Tableau 28: Répartition de <i>Listeria</i> dans l'environnement de 4 usines alimentaires.	page 95
Tableau 29: Relation entre le dénombrement des indicateurs et la présence de <i>Listeria</i> dans des prélèvements d'environnement.	page 97
Tableau 30: Relation entre la présence de <i>Listeria</i> et la numération des indicateurs repartis dans deux intervalles choisis arbitrairement.	page 98

## TABLE DES SIGLES

- AFNOR = Association Française de Normalisation
- BPU = Bactometer Processing Unit
- CCP = Critical Control Points
- CEE = Communauté Economique Européenne
- CFU = Colonie Formant Unité
- CPG = Chromatographie Phase Gazeuse
- CSHPF = Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France
- DEFT = Direct Epiflorescent Filter Technique
- DGCCRF = Direction Générale de la Concurrence de la Consommation et de la Répression des Fraudes
- EIA = Enzyme Immuno Assay
- ELISA = Enzyme Linked Immuno-Sorbant Assays
- FDA = Food and Drug Administration
- FIC = Fédération des Industries Charcutières
- FIL = Fédération Internationale de Laiterie
- HACCP = Hazard Analysis Critical Control Points
- HPLC = High Performance Liquid Chromatography
- ISO = International Standard Organisation
- ICMSF = International Commission Microbiological Specifications for Food
- IDF = International Dairy Federation
- LPM = Lithium chloride Phenylethanol Moxalactam Agar
- MMA = Modified MacBride Agar
- NF = Norme Française
- OMS = Organisation Mondiale de la Santé
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- PM = Poids Moléculaire
- PVC = Pourcentage de Variation de Capacitance (ou % change sur les courbes de capacitance)
- NGFIS = Netherlands Government Food Inspection Service
- TD = Temps de Détection (en heures)
- USDA-FSIS = U.S. Department of Agriculture, Food, Safety and Inspection Service
- USTL = Université Scientifique Technologique de Lille
- WIBG = Whitley Impedance Broth Glucose

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Les épidémies survenues sur le continent Nord Américain entre 1981 et 1985 (Schlech et coll., 1983; James et coll., 1985; Ryser et coll., 1985; Ho et coll., 1986; Linnan et coll., 1988) ont permis d'établir un lien entre l'apparition de listériose et la consommation de produits alimentaires contaminés par l'espèce *Listeria monocytogenes*. Ainsi, le retrait du marché des fromages suspectés lors de la listériose apparue en Suisse, a permis de réduire considérablement le nombre de nouveaux cas d'infection (Bille, 1990). La sévérité des symptômes ainsi que la possibilité de survie dans l'environnement de l'atelier a suscité un intérêt pour ce germe.

Dans le milieu industriel, *Listeria* est retrouvée dans les caniveaux, sur les sols, dans l'eau stagnante, dans les résidus et sur les surfaces en contact ou à proximité des produits (Watkins et Sleath, 1981; Palumbo et Williams, 1990; Klausner et Donnelly, 1991). Cette situation peut conduire à une contamination des produits après la transformation comme ce fût le cas de produits pasteurisés en 1985 (Fleming et coll., 1985) et plus récemment de la langue de porc en gelée en 1992 ou de rillettes de porc en 1993 en France (Goulet et coll., 1993). Le principal facteur à maîtriser semble donc être l'hygiène de l'environnement. Il est nécessaire de mettre en place des mesures de prévention rapides et efficaces pour mieux contrôler les possibilités de croissance de *Listeria*. Mais la lourdeur et les délais de réponse liés à la microbiologie classique sont peu compatibles avec les impératifs économiques actuels.

Avec le développement de la génétique et de l'électronique, plusieurs méthodes dites "rapides" ont vu leur apparition. Les unes sont basées sur le comptage des cellules (Redigel System, DEFT, Cytométrie de flux ou Cytométrie de filtre...), sur la détection d'un constituant cellulaire (EIA, PCR, Sondes nucléiques, Glutamate décarboxylase, ATPmétrie...), les autres sur la mesure de l'activité du milieu (Radiométrie, Manométrie, Potentiel d'oxydo-réduction, Impédancemétrie, Calorimétrie...). Certaines de ces méthodes sont intéressantes du point de vue fondamental mais présentent de nombreuses difficultés au moment de leur utilisation dans les aliments à cause des réactions croisées ou des interférences (Botha et coll., 1986; Donnelly et Baigent, 1986; Donnelly et coll., 1988).

Jusqu'aux années 1970, les applications de l'impédancemétrie étaient limitées au domaine médical car les appareils disponibles ne permettaient la mesure que d'un seul échantillon à la fois. Mais son intérêt s'est accru à la suite du symposium international sur les méthodes rapides tenu en 1973 avec la présentation de deux appareils (Cady, 1973; Ur et Brown, 1973) dont l'un pouvait analyser jusqu'à 32 échantillons.

L'impédancemétrie a été largement utilisée avec succès pour le dénombrement de la flore totale d'altération (Griffiths et Phillips, 1984; Weihe et coll., 1984; Ogden, 1986; Piton et Dasen, 1988). La méthode reste encore perfectible pour le dénombrement spécifique des coliformes et *E. coli* (Gibson, 1987; Ogden et Cann, 1987; Ogden, 1988), pour la recherche des Salmonelles (Martins et Selby, 1980; Firstenberg et coll., 1984; Bullock et Frodsham, 1989; Ogden, 1993). Dans le cas de *Listeria*, très peu de travaux sont publiés.

Phillips et Griffiths (1989) ont été les premiers à décrire des travaux concernant la possibilité d'une utilisation de l'impédancemétrie pour la détection de *Listeria*. Les milieux AC et RLM donnaient des résultats prometteurs par la mesure de la capacitance. En suivant l'évolution de la conductance de quatre souches de *Listeria*, seuls les milieux OXB et AC permettaient la mise en évidence de ces espèces. Mais les courbes de conductance suivies étaient irrégulières et leur amplitude était faible. Parmi les microorganismes de la flore annexe examinés, 8/9 souches de *Bacillus* cultivaient bien dans le milieu AC. En modifiant la composition de ce milieu par addition de l'acide nalidixique à la concentration de 10 à 40 mg/l, toutes les souches de *Bacillus* testées étaient inhibées. Mais le milieu AC sous sa nouvelle formulation ne permettait pas de distinguer les courbes de *Listeria* de celles d'autres bactéries: *Alcaligenes denitrificans*, *Enterobacter agglomerans*, *Flavobacterium multivarum* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Bolton (1990) a évalué quant à lui, la technique de l'impédancemétrie indirecte pour détecter *L. monocytogenes*. Le milieu WIBG utilisé a été supplémenté avec 15 g/l de LiCl. Mais cet auteur n'a pas testé sa sélectivité vis à vis de la flore annexe de contamination et ses conclusions ne portaient que seulement sur deux souches de *L. monocytogenes* utilisées. Dans son article, Powell (1990) décrivait une méthode d'application de l'impédancemétrie à la détection de *Listeria* dans les produits finis. Cette méthode utilisait un enrichissement sélectif avec les bouillons LEB ou UVMI selon la catégorie d'aliments examinés. Mais une étude a montré que l'analyse de 189 échantillons de laits et produits laitiers, de végétaux, de produits de mer et, 76 échantillons de produits carnés par cette méthode, donnait respectivement 4 et 16% de faux positifs (Bolton et Powell, 1990).

Poursuivant les recherches, Hancock et coll. (1993) ont rapporté que des fromages contaminés artificiellement avec *L. monocytogenes* à des taux de  $10^3$  et  $10^4$  cfu/g donnaient une réponse en impédancemétrie en moins de 30 heures lorsque la concentration du supplément sélectif de leur milieu était doublée. Ils obtenaient une bonne corrélation ( $r = -0,99$  pour  $n = 28$ ) entre les temps de détection et le nombre de

*L. monocytogenes* obtenu par la technique classique de numération sur boîte de Petri. Mais ces auteurs ne faisaient allusion à aucun signal typique de *Listeria*. Par ailleurs toutes les espèces de *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* et *L. murrayi* testées au cours de leur étude étaient inhibées.

Cependant l'ensemble des travaux publiés donnent des informations utiles et nécessaires en vue d'améliorer les conditions de détection de *Listeria* par impédancemétrie.

Le but de notre travail est de développer une méthode rapide de détection de *Listeria* utilisant la technique d'impédancemétrie. Elle doit être facile à mettre en oeuvre et applicable aux prélèvements d'environnement de sites industriels. Le coût des analyses doit être acceptable industriellement en vue d'une application à un grand nombre d'échantillons.

La logique expérimentale que nous adopterons sera dans un premier temps, la sélection d'une base convenable à la technique d'impédancemétrie. Par une approche de plans d'expériences fractionnaires, nous allons formuler et optimiser le supplément sélectif de cette base. Une validation sera alors faite sur des souches pures de *Listeria* et de la flore de compétition afin d'évaluer sa sélectivité et sa spécificité. Dans un deuxième temps un protocole sera établi prenant en compte les conditions optimales de détection de *Listeria* puis une évaluation sera faite sur des prélèvements en provenance de différents sites industriels. Les souches de *Listeria* identifiées seront caractérisées en CPG. La comparaison de notre méthode avec celle référencée AFNOR V08 055 à travers le traitement statistique des résultats, nous permettra de conclure sur les avantages à utiliser la méthode d'impédancemétrie pour une recherche rapide de *Listeria* dans le cadre d'une démarche de contrôle de qualité basée sur le système HACCP.

Le HACCP est une méthode permettant:

- d'identifier et d'analyser les dangers associés aux différents stades du processus de fabrication d'une denrée alimentaire,
- de définir les moyens nécessaires à leur maîtrise,
- de s'assurer que ces moyens sont mis en oeuvre de façon efficace.

C'est un outil de gestion de la qualité qui, en situation contractuelle peut être un gage de confiance.

# GENERALITES

# I- GENERALITES

## I-1 GENERALITES SUR *LISTERIA*

### I-1 1 TAXONOMIE

La classification des microorganismes bénéficie de nos jours de l'évolution des recherches en biologie moléculaire, en biochimie et en taxonomie numérique. Cette dernière a été proposée au XVIII<sup>e</sup> siècle par Adenson. Les limites d'un groupe microbien (groupes naturels d'organismes), sont déterminés par le degré de ressemblance entre les individus. Pour obtenir des résultats probants il faut utiliser un nombre élevé de caractères et travailler sur de grands échantillons. Le degré de ressemblance est exprimé par un coefficient de similarité qui correspond au pourcentage des caractères partagés par deux organismes ou par deux groupes d'organismes (Regnault, 1990).

Selon les données de la taxonomie numérique, plus récemment des hybridations ADN/ADN et du catalogue des séquences partielles de l'ARN ribosomique 16S, le genre *Listeria* est proche du genre *Brochothrix* (Ludwig et coll., 1984; Jones et Seeliger, 1987). Les deux genres occupent une position entre *Lactobacillus* et *Bacillus* et appartiennent à la branche formée par *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia*, *Gemella* et *Erisipelothrix*. Cette position au sein des bactéries à Gram positif est confirmée par un faible G+C mol. p. 100 (36-42) et par la présence d'acides lipoteichoïques spécifiques de cette branche, ainsi que par l'absence d'acides mycoliques. Le genre *Listeria* comprend actuellement 7 espèces divisées en deux branches génomiquement proches. L'une est formée par *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri*; l'autre par *L. grayi*. *L. denitrificans* qui s'est avérée partager certains caractères avec des bactéries corynéformes dans de nombreuses études, a été reclassée dans un autre genre appelé *Jonesia* (Rocourt, 1988).

### I-1 2 MARQUEURS PHENOTYPIQUES

La caractérisation phénotypique de *Listeria* fait appel aux méthodes de détermination des caractères morphologiques et biochimiques. C'est un petit bacille, trapu, de 0,4-0,5µm de diamètre sur 0,5-2µm de longueur aux extrémités arrondies. Gram positif, les cellules apparaissent isolées, en amas, en courtes chaînettes et surtout en palissade.

Les cultures vieilles ou rough (R) sont plutôt filamenteuses et peuvent présenter la coloration Gram négatif. Aéro-anaérobie facultatif, *Listeria* est non sporulée, non capsulée et possède une mobilité en pirouette observée à l'état frais à partir d'un bouillon de 24 heures à 20-25°C. A 37°C peu de flagelles sont produits: habituellement un flagelle polaire, occasionnellement deux à quatre mais quelques fois aucun. Ainsi *Listeria* apparaît immobile lors de l'observation à l'état frais après une culture de 24 heures à 37°C en milieu liquide.

La fermentation des sucres se fait avec production d'acétoïne (VP, réaction de Voges-Proskauer) mais sans gaz ni d'hydrogène sulfuré. La réaction rouge de méthyl (RM) est positive. L'esculine est rapidement hydrolysée mais le citrate de Simmons n'est pas utilisé. Cette bactérie possède une phosphatase alcaline et contient des cytochromes (abb<sub>1</sub> ou ab<sub>1</sub>d<sub>0</sub>) qui prouvent bien son caractère aérobie. Oxydase négative (ou absence du cytochrome C<sub>2</sub>), *Listeria* pourra néanmoins respirer par la phosphorylation oxydative soit en contournant le cytochrome C<sub>2</sub>, soit en utilisant une voie métabolique accessoire, comme la voie cytochromique indirecte décrite par Marchal et coll. (1987), car elle possède la catalase (Figure 1). Ainsi les hydrates de carbones peuvent être métabolisés par la voie oxydative. L'indole et l'urée ne sont pas produits, le nitrate n'est pas réduit. La gélatine et la caséine ne sont pas hydrolysées (Seeliger et Jones, 1986).

### I-1 3 CARACTERES CULTURAUX

*Listeria* cultive bien sur gélose ordinaire et sa température optimale se situe entre 30° et 37°C. Après 24 heures d'incubation, on observe de petites colonies de 1 à 2mm de diamètre; lisses à bords réguliers, transparentes et prenant un aspect bleuté par transillumination oblique selon la méthode de Gray. Sa résistance à différentes substances chimiques et antibiotiques a permis de mettre au point de nombreux milieux sélectifs pour son isolement à partir de prélèvements polycontaminés. Les plus connus sont les milieux Palcam, Oxford, MMA, LPM,... Dans ces milieux, sont introduits le plus souvent des indicateurs colorés ou des substrats qui permettent de distinguer les colonies de *Listeria* de celles des autres microorganismes présents.

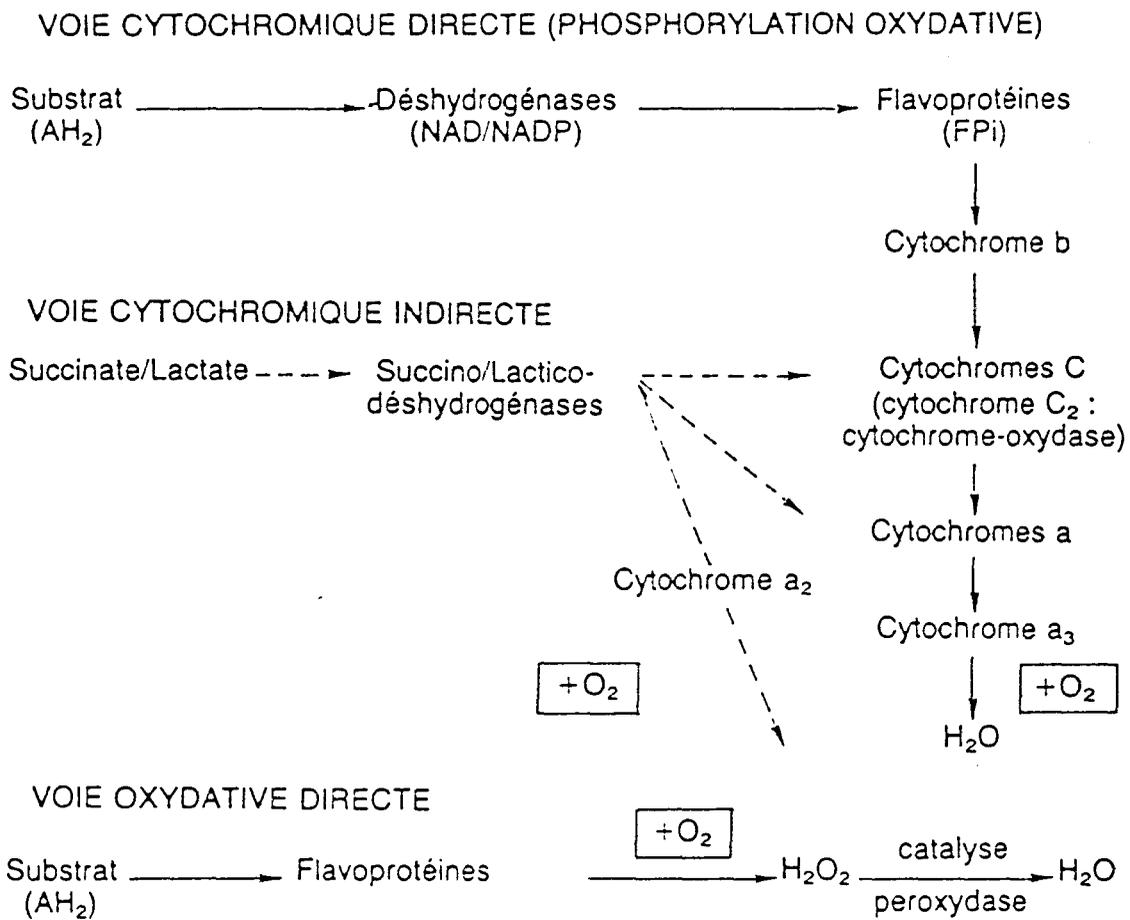


Figure 1: Schéma des processus énergétiques des bactéries hétérotrophes en aérobose (d'après Marchal et coll., 1987).

## I-1 4 TYPAGES MOLECULAIRES

L'incrimination d'un aliment contaminé à l'origine de cas de listériose humaine nécessite une caractérisation très fine des souches isolées simultanément de l'aliment suspect et chez les patients. Il est donc indispensable de disposer de systèmes de typage fiables et reproductibles. Quatre principales méthodes de typage de *Listeria* sont utilisées lors des investigations épidémiologiques:

**-la sérotypie:** Les différentes associations de 5 antigènes flagellaires et 14 antigènes somatiques définissent 16 sérovars pour le genre *Listeria* selon le schéma de sérotypie établi par Donker Voet et Seeliger. Le sérovar constitue un caractère d'identification supplémentaire dans le cas de *L. ivanovii* où toutes les souches de cette espèce appartiennent au sérovar 5 et réciproquement. Il est important de noter qu'en dépit de la diversité des sérovars, les souches de *L. monocytogenes* isolées chez l'homme sont représentées par les sérovars 1/2a, 1/2b et surtout 4b alors que la majorité des souches d'origine alimentaire sont caractérisées par le sérogroupe 1/2.

**-la lysotypie:** De nombreux phages ont été isolés à partir de souches lysogènes pour les différentes espèces de *Listeria* (sauf *L. grayi*). Leur spectre lytique, qui est spécifique de l'espèce et/ou du sérogroupe des souches bactériennes, permet de diviser des souches de même sérovar en plusieurs groupes. En conséquence, le lysovar peut apporter une aide précieuse comme marqueur complémentaire d'identification. Mais malgré sa reproductibilité et son caractère discriminatoire, cette technique est limitée par la faible proportion des souches typables dans le sérogroupe 1/2 (environ 50%) et par l'absence de phages chez d'autres sérovars dont 3, 4a, 4ab, 4c, 4d, 4e et 7 (Rocourt et coll., 1985; Audurier et Martin, 1989).

**-l'électrophorèse d'isoenzymes:** Elle consiste à évaluer la variation génétique au sein d'une population bactérienne grâce à l'analyse comparative de la mobilité électrophorétique d'un nombre large d'enzymes métaboliques (Selanger et coll., 1986). L'importance de cette technique tient au fait que la majorité des souches responsables d'épidémies semblent appartenir au même électrophorétype (Piffaretti, 1989).

**-les profils de restriction de l'ADN:** La méthode a été utilisée pour caractériser des souches de *L. monocytogenes* isolées lors de certaines épidémies. Dans le cas de celles survenues en Nouvelle-Ecosse, à Los Angeles et à Massachusetts, les souches de *L. monocytogenes* isolées présentaient chacune le même profil de restriction (Wesley et Ashton, 1991). Cette technique peut permettre également d'étudier des souches non typables.

D'autres méthodes fines existent mais leur utilisation est limitée. On peut citer le profil de restriction des ARN ribosomiques, le typage plasmidique et la bactériocinotypie (Perez-Diaz et coll., 1982; Wilhelms et Sandow, 1989). Si le typage de la monocine est prometteur pour la caractérisation des souches épidémiologiques de *L. monocytogenes*, seulement 59% et 56% des sérovars respectifs 1/2a et 4b sont connus comme produisant cette protéine.

## I-1 5 PATHOGENICITE-VIRULENCE

Selon les données épidémiologiques, seule *L. monocytogenes* est réellement pathogène chez l'homme. *L. seeligeri* est très rarement mise en cause alors que *L. ivanovii* a été associée à des infections chez les animaux. Les autres espèces sont inoffensives. *L. monocytogenes* est une bactérie pathogène opportuniste, atteignant préférentiellement les sujets dont le système immunitaire est perturbé: femmes enceintes et nouveaux-nés, sujets immuno-déprimés, les enfants et les personnes âgées. La manifestation clinique présente les formes nerveuses, septicémiques et foeto-maternelle dont l'évolution est souvent fatale.

Sa virulence est due à sa capacité de pénétrer dans les cellules, de s'y multiplier et de se propager ensuite dans les tissus sous-jacents en passant directement d'une cellule à l'autre. Le facteur principal de virulence est la synthèse de l'hémolysine ou listériolysine O (Geoffroy et coll., 1988; Cossard et Mengaud, 1989). Le processus infectueux est multigénique et cyclique impliquant plusieurs étapes. L'entrée de la bactérie dans les cellules épithéliales s'effectue grâce à une protéine associée à la paroi, appelée l'internaline et qui appartient à la famille des protéines riches en leucine. Elle est codée par le gène *inlA*. Le gène *inlB* semble nécessaire à son expression correcte.

La sortie de la vacuole de phagocytose se fait par une lyse de la membrane de la vacuole. Elle est possible grâce à la listériolysine codée par le gènes *HlyA* et la lecithinase, codée par le gène *plcB*. Le pH optimal est à 5,5 c'est à dire le pH vacuolaire. Une fois dans le cytoplasme de la cellule, la bactérie se déplace grâce à un phénomène au cours duquel la bactérie polymérise l'actine cellulaire. L'actine polymérisée est visible derrière la bactérie lors de son passage. Le gène nécessaire à ce déplacement est le gène *actA* qui code pour une protéine de surface, *ActA*. Lorsque la bactérie atteint la membrane plasmique, elle engendre la formation de protrusions qui contiennent une bactérie à leur extrémité. Ces protrusions sont ensuite phagocytées par

la cellule adjacente, emprisonnant ainsi les bactéries dans des vacuoles à double membrane. La lyse de ces vacuoles est médiée par une phospholipase C spécifique de la phosphatidyl-choline. Tous ces gènes de virulence sont sous le contrôle du gène *prfA* codant pour un activateur global. Ils sont mieux exprimés à 37°C et en phase exponentielle de croissance.

## I-1 6 ECOLOGIE DE *LISTERIA*

*Listeria* est un germe ubiquitaire car elle est largement présente dans l'environnement qui en constitue le réservoir. A l'exception de *L. grayi*, 4 à 30% de porteurs sains sont signalés dans le contenu intestinal chez les hommes et les animaux (Rocourt, 1989a; Jensen, 1993). Sa survie voire sa multiplication sont dues à ses capacités adaptatives aux conditions sévères de son biotope. A titre d'exemple elle peut croître à des températures allant de 2°C à environ 45°C, se développer à des pH compris entre 5 et 9,6 et tolérer des concentrations de sel de 10% et à une  $a_{w}$  de 0,94. La congélation bloque son développement en provoquant des stress mais ne semble avoir aucun effet sur sa destruction. Par contre, les températures positives (exemple +4°C) la sélectionnent (Golden et coll., 1988). Il est alors aisé de comprendre que la conservation plus ou moins prolongée des denrées alimentaires en enceinte réfrigérée amplifie la contamination.

Les milieux humides et la présence de résidus organiques semblent entretenir son implantation et sa dissémination dans les ateliers de fabrication. Ces résidus sont responsables de la formation de biofilms qui peuvent héberger et entretenir la croissance de *L. monocytogenes* (Jeong et Frank, 1994). Sa multiplication dans les produits laitiers pourra être favorisée par la présence de certaines flores de contamination dont *Pseudomonas spp.* (Marshall et Schmidt, 1988), les levures et *Lactococcus lactis* (Premaratne et coll., 1991).

## I-1 7 LES TRAITEMENTS NATURELS ANTI-*LISTERIA*

L'élimination de *Listeria* des aliments contaminés, par des moyens non dénaturants, compatibles avec les exigences des consommateurs est difficile à réaliser. L'utilisation des systèmes antimicrobiens naturels ou des flores antagonistes (exemple des flores lactiques), des conservateurs chimiques ou biochimiques est une voie intéressante de lutte contre *L. monocytogenes*. Mais des études approfondies sont nécessaires dans ce domaine.

**-les flores compétitives:** Wenzel et Marth (1991) ont observé "l'écrasement" de *L. monocytogenes* par une forte population initiale de Streptocoques lactiques. La compétition pour les éléments nutritifs et la multiplication rapide de la flore antagoniste expliquaient ce résultat. L'acidification du milieu par certaines flores lactiques et par conséquent, la baisse du pH peut inhiber *Listeria*. Dans le cas du lait cru, le peroxyde d'hydrogène produit est susceptible d'activer le système lactoperoxydase naturellement présent avec libération de différents oxyacides dont l'ion hypothiocyanate ( $\text{OSCN}^-$ ), agent bactéricide majeur. Ses effets inhibiteurs sur *L. monocytogenes* ont été prouvés (Denis et Ramet, 1989; Gaya et coll., 1991). Si cette technique est recommandée par la FIL pour la conservation du lait cru dans des cas critiques, la présence de composés réducteurs, la température, les cellules lésées et la taille de l'inoculum limitent son efficacité.

Les bactéries lactiques sont capables de produire également une variété de bactériocines. Ce sont des substances protéiques bactéricides dotées d'un spectre d'activité limité à un petit nombre de bactéries. Ces substances sont sensibles aux enzymes protéolytiques, résistantes à la pasteurisation et stables à pH acide ou neutre. Trois produits sont actuellement commercialisés sous forme de conservateur. Le Nisaplin composé de nisine sur un support lait, le Micrograd composé de bactériocines et d'acides organiques produits par une souche de *Propionibacterium* et Alta composé de bactériocines produites par des *Pediococcus*, mélangées à des acides organiques et à des agents aromatisants. Parmi les bactériocines, la nisine est la plus étudiée. Elle peut inhiber la plupart des bactéries Gram positif et a reçu l'autorisation d'être utilisée en tant qu'additif alimentaire en Europe et aux Etats-Unis. Sa présence dans les aliments permet de réduire ou d'inhiber *L. monocytogenes* (Carminati et coll., 1989; Patin et coll., 1992).

**-le lysozyme:** Il est décrit comme étant une N-acétyl hexosaminidase et classé comme une muramidase. Il présente une action lytique sur la paroi externe de plusieurs bactéries par hydrolyse des liaisons  $\beta$  (1,4) entre l'acide N-acétylmuramique et la N-acétylglucosamine (Proctor et Cunningham, 1988). Les bactéries Gram positif sont les plus sensibles à cause de la structure de leur paroi qui renferme la molécule cible. L'utilisation du lysozyme est très répandue au Japon, où des aliments tels que les saucisses, les gâteaux de poissons peuvent être préservés de la prolifération de certaines bactéries. Mais *L. monocytogenes* n'est sensible à le lysozyme que sous certaines conditions de température, de pH et d'activité d'eau (Wijtzes et coll., 1993; Johansen et coll., 1994).

## I-1 8 LES TRAITEMENTS PHYSIQUES ANTI-*LISTERIA*

Trois agents physiques sont utilisés dans l'industrie pour réduire les populations microbiennes dans les produits alimentaires et leurs environnements immédiats: la chaleur, les radiations ultra-violettes (UV) (Youssef et Marth, 1988) et les radiations ionisantes. Malgré le faible nombre de publications sur les effets de ces dernières, des résultats homogènes sont obtenus dans la fourchette de 0,15 à 2 kGy (Huhtanen et coll., 1989; Patterson, 1989; Farag et coll., 1990). Des fromages traités avec une dose de 2,6 kGy ont conservé leurs propriétés organoleptiques tandis que de fortes populations initiales de *L. monocytogenes* étaient inhibées (Bougle et Stahl, 1994).

Dans le cas du traitement par la chaleur, les phénomènes d'acquisition de thermorésistance par *L. monocytogenes* au cours de chocs thermiques (Fedio et Jackson, 1989; Farber et Brown, 1990; Linton et coll., 1990) peuvent être inquiétants pour les consommateurs de plats cuisinés, réfrigérés et à conservation prolongée au froid. En effet lors de la cuisson, une montée lente de la température pourrait susciter une thermorésistance chez les bactéries éventuellement présentes. Mais il semble que *L. monocytogenes* ne résiste pas à une pasteurisation normale à 71,7°C en 15 sec (Bradshaw, 1985).

## I-1 9 LES CRITERES

Il n'existe pas à l'heure actuelle de réglementation internationale concernant la présence de *Listeria* dans les produits finis et dans l'environnement. Des modèles recommandations/réglementations sont proposées par chaque pays. Vu les risques de santé publique et les enjeux économiques sur le marché international, l'absence de *Listeria* dans 25g d'aliment est recherchée dans différentes catégories d'aliments. Mais selon l'avis du CSHPF, il est techniquement impossible de garantir l'absence totale de *L. monocytogenes* dans les denrées animales ou végétales brutes, ainsi que dans les produits manipulés ou transformés, à l'exception de ceux ayant subi un traitement d'assainissement. Un groupe informel d'experts de l'OMS réuni à Genève en 1988 à proposé de classer les aliments en quatre catégories en fonction des risques encourus: les aliments crus, les aliments crus transformés, les aliments transformés et les aliments fabriqués. Certains pays comme l'Allemagne préconisent la tolérance de  $10^2$  *L. monocytogenes*/g.

Selon la FIC, le critère  $10^2$  *L. monocytogenes*/g pendant toute la durée de vie du produit jusqu'à sa remise au consommateur, serait un bon compromis entre un niveau de sécurité satisfaisante et la sensibilité des méthodes de recherche. Lovett (1988) puis Farber et Peterkin (1991) ont rapporté que lorsque des analyses quantitatives sont pratiquées, en règle générale les produits alimentaires ne contiennent que de faibles niveaux de *L. monocytogenes* ( $< 10^2$  cfu/g). Dans une circulaire datant de Mai 1994, le Codex Alimentarius proposait les critères suivants au cas où le risque *L. monocytogenes* est réduit dans une denrée alimentaire donnée:  $n=5$  ( $n$  est le nombre d'unités dans un échantillon),  $c=0$  ( $c$  est le nombre maximum acceptable d'unités de qualité marginale),  $m \leq 100/g$  pour les aliments destinés aux individus bien portants ( $m$  est le dénombrement bactérien qui sépare les produits de qualités bonne et marginale);  $n=15$ ,  $c=0$ ,  $m=0/25g$  pour les aliments destinés aux individus particulièrement vulnérables.

Les seules démarches communes à beaucoup de pays dans le cas d'une infection par *L. monocytogenes* sont généralement le retrait des produits incriminés avec destruction des lots, lavage et désinfection des ateliers de fabrication. Mais selon l'OMS et le Codex Alimentarius seules les actions de préventions efficaces à travers des démarches HACCP permettront de minimiser les risques *Listeria*.

### I-1 10 LES METHODES OFFICIELLES DE RECHERCHE DE *LISTERIA*

Parmi les méthodes de référence pour la recherche de *Listeria*, six sont largement utilisées. Ce sont les méthodes FDA et IDF, USDA-FSIS respectivement utilisées pour les produits laitiers et carnés (Anonyme, 1988; McClain et Lee, 1988). Les méthodes NGFIS, AFNOR V08 055 et ISO sont appliquées à tous les types de produits alimentaires et d'environnement (van Netten et coll., 1989; Anonyme, 1993). Toutes ces méthodes sont basées sur des enrichissements sélectifs en milieux liquides suivis d'isolement soit sur la gélose sélective Palcam (surtout en Europe), soit sur les géloses sélectives Oxford, Oxford modifié, LPM ou MMA (en particulier en Amérique du Nord). Elles sont caractérisées par la lourdeur, le coût en consommables et le temps d'analyse qui s'étend sur en moyenne une semaine.

Malheureusement elles ne sont pas toujours pleinement satisfaisantes. Des études de comparaison de ces méthodes ont montré des résultats discordants avec la présence de nombreux faux positifs et faux négatifs dus respectivement à la flore de compétition et à la présence de cellules de *Listeria* lésées par des traitements stressants (Lund et coll., 1990; Warburton et coll., 1991; Gunasinghe et coll., 1994).

## I-2 GENERALITES SUR L'IMPEDANCEMETRIE

### I-2 1 HISTORIQUE DE LA MESURE DE L'IMPEDANCE

La variation de l'impédance due au métabolisme microbien a été rapportée pour la première fois dans les années 1900 par Steward (1899). Il montra que, la conductance du sang défibriné en putréfaction, augmentait au cours du temps. Il postulait alors que des ions étaient formés à partir des protéines et lipides du sang à la suite du métabolisme bactérien et que la mesure de la variation électrique du milieu pouvait être significative du taux de croissance bactérienne. Quelques années plus tard Oker-Blom (1912) observait que la mesure de la conductance d'un milieu reflétait en général les processus métaboliques survenus et déplorait le fait que cette technique n'ait pas été acceptée parmi les principales méthodes de mesure en bactériologie. Il présumait que la variation de la conductivité des cultures de lait était due à la conversion du lactose en acide lactique.

Parsons et Sturges (1925, 1926), et plus tard Parsons et coll. (1929) travaillant sur des produits carnés, mentionnaient la relation de proportionnalité entre les variations de conductance et la production d'ammoniaque par les cultures de *Clostridium* spp. dans différents types de milieux et sous des conditions d'anaérobiose. Ils suggèrent la possibilité de mesurer la conductivité due au métabolisme fermentatif à partir de substrats carbonés. Dix années après, Alison et coll. (1938), poursuivant les travaux de Parsons ont rapporté qu'il existait de très bonnes corrélations entre les variations de conductance, de pH, de production de dioxyde de carbone, d'ammonium et le nombre de microorganismes.

En 1958 de nouvelles études sont menées par McPhillips et Snow (1958). Grâce à leur appareil, ils pouvaient suivre dans le temps l'évolution de l'acidité du lait par *Streptococcus lactis* en mesurant la variation de conductance. Schwan (1966) a mené des investigations sur l'effet des échantillons biologiques sur la polarisation des électrodes. Il expliquait que les cellules proches des électrodes formaient un ombrage sur ces dernières. A basse fréquence, les cellules sont faiblement conductrices et permettent le passage du courant qui peut être suivi par la mesure de l'impédance. Il notait également que ces mesures dépendaient fortement de la préparation des électrodes.

Mais c'est dans le domaine médical que la technique fut la mieux divulguée (Ur, 1970a, 1970b). Ainsi Wheeler et Goldschmidt (1975) grâce à un appareil alimenté avec un courant de 10 Hz ont utilisé la méthode de l'impédancemétrie pour estimer le nombre de microorganismes présents dans des échantillons d'urines. Ils notaient une relation de proportionalité entre l'impédance mesurée et le nombre de cellules bactériennes pour des populations comprises entre  $10^3$  et  $10^9$  cfu/ml. Poursuivant les recherches, Ur et Brown (1975) ont observé que les temps de latence du signal impédancemétrique étaient d'autant plus longs que les milieux étaient fortement tamponnés. Ils préconisaient la modification des milieux usuels afin d'optimiser les réponses.

En décrivant le Bactometer, Hadley et Senyk (1975) ont signalé que la sensibilité de détection des produits du métabolisme bactérien était améliorée lorsqu'on utilisait au départ des milieux faiblement ionisés. Mais Throm et coll. (1977) notaient que la technique de l'impédancemétrie présentait souvent des limites en reproduisant des faux négatifs et des faux positifs. Cady et coll. (1978b) expliquaient l'origine de ces derniers par la présence de substances anti-bactériennes dans les échantillons d'urines. Ils ont rapporté que les dilutions des échantillons au cours de leur préparation, la possibilité de diffusion et d'adsorption des inhibiteurs sur la surface des géloses pouvaient être à l'origine de la meilleure sensibilité de la méthode classique comparée à l'impédancemétrie.

Ces données scientifiques complétées en cela par les progrès en électronique ont contribué à améliorer les performances des appareils avec des applications substantielles en agro-alimentaire. Mais malgré ses avantages, cette méthode restera peu utilisée en routine jusqu'à nos jours. Cette situation vient de la difficulté à formuler des milieux appropriés mais aussi à définir les paramètres de culture (température et délai d'incubation, pH des milieux,...). Parmi les travaux publiés, une large place est faite à son utilisation pour l'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru: Cady et coll. (1978a), O'Connor (1979), Gnan et Luedecke (1982), Martins et coll. (1982), Bossuyt et Waes (1983), Firstenberg (1984), Phillips et Griffiths (1985), Nieuwenhof et Hoolwerf (1987).

Pour la détection de microorganismes particuliers, certains travaux existent. On peut citer ceux de: Silverman et Munoz (1979), Firstenberg et Klein (1983a), Fryeer et Forde (1989), pour le dénombrement des coliformes; Gatti et Neviani (1993) pour la détection des Enterocoques; Evans (1982), Ebina et coll. (1989), Iren et coll. (1989, 1990) pour la caractérisation des levures. Dans le cas de *Listeria*, les difficultés liées à la présence constante de faux positifs et à la reproductibilité du signal ont fortement ralenties son utilisation dans les matrices alimentaires.

Des essais effectués sur des souches pures de *Listeria* et la flore associée ont montré globalement qu'il est possible de détecter *Listeria* par la technique de l'impédancemétrie (Phillips et Griffiths, 1989; Bolton, 1990). Ces résultats ont été confirmés par la suite sur des échantillons de produits finis par d'autres auteurs qui ont cependant signalé la présence de nombreux faux positifs et faux négatifs (Bolton et Powell, 1990; Eley, 1990; Hancock et coll., 1993).

## I-2 2 THEORIE DE L'IMPEDANCEMETRIE DIRECTE

L'impédance est la résistance que subit un courant alternatif pour traverser un matériau conducteur. C'est un paramètre complexe résultant de la capacitance et de la conductance (voir formule ci-dessous). L'unité de mesure de la capacitance C est exprimée en microfarads ( $\mu\text{F}$ ) alors que l'impédance Z est en ohm ( $\Omega$ ), la conductance G (ou  $1/R$ ) en microsiemens ( $\mu\text{s}$ ) et la fréquence f du courant appliquée au système se mesure en hertz (Hz). A partir de la formule on peut déduire que toute augmentation de G et/ou C conduit à une baisse de Z et une élévation de la fréquence f du courant. La première approche d'un tel système est le modèle d'un condensateur en série avec une résistance (Figure 2).

$$Z^2 = R^2 + 1/(2\pi fC)^2$$

ou encore

$$Z^2 = (1/G)^2 + 1/(2\pi fC)^2$$

C = Capacitance (microfarads)

G = Conductance (microsiemens)

f = Fréquence (hertz)

R = Résistance (ohm)

Z = Impédance (ohm)

Lorsqu'on utilise des milieux de culture réducteurs et peu tamponnés, le métabolisme bactérien se traduit par des changements significatifs des propriétés électriques du milieu. Ces changements sont liés à la dégradation des substrats du milieu en molécules plus petites (PM réduit), plus mobiles et de charge électrique plus élevée comme par exemple celle des hydrates de carbone en acides organiques, ou des protéines en acides aminés. Ces variations peuvent être mesurées en plaçant deux électrodes en acier inoxydable (cathode et anode) dans le récipient contenant les cultures.

Lorsque la production d'ions dans le milieu devient suffisante, on observe une modification significative de la conductivité du milieu: seuil de détection caractérisé en unité de temps par un temps de détection (TD en heures). A ce moment la population bactérienne dans les cupules de mesure est en général d'environ  $10^6$ - $10^7$  cellules/ml (Cady et coll., 1978c; Firstenberg, 1983). Le temps nécessaire pour atteindre le seuil de détection est d'autant plus grand que le niveau de contamination initiale du produit est faible. On peut démontrer mathématiquement et expérimentalement qu'il existe une relation linéaire décroissante entre le TD du signal électrique et le nombre initial de microorganismes.

Ainsi comme pour la microbiologie traditionnelle, l'impédancemétrie est basée sur l'amplification de la biomasse cellulaire et en plus surtout sur l'augmentation de la concentration ionique du milieu. Mais dans le cas des levures, des moisissures et de certaines bactéries produisant des métabolites finaux peu chargés (Deak et Beuchat, 1993; Franken et von der Zouwen, 1993), la détection est rendue difficile. De même des métabolites formés ou des particules d'échantillons alimentaires peuvent interférer avec la stabilité des réponses (Connolly et coll., 1988; Henschke et Thomas, 1988). Ces problèmes peuvent être évités en utilisant l'impédancemétrie indirecte.

### I-2 3 THEORIE DE L'IMPEDANCEMETRIE INDIRECTE

Owens et coll. (1989) ont été les premiers à énoncer le principe de l'impédancemétrie indirecte. Dans une cellule de mesure contenant un milieu de culture ensemencé, on y introduit un tube contenant une solution d'hydroxyde de potassium (KOH). On adapte les électrodes qui immergent directement dans la solution de KOH. Une réaction entre le  $\text{CO}_2$  dégagé et le KOH va produire une importante diminution de la conductance initiale du milieu selon la réaction suivante:



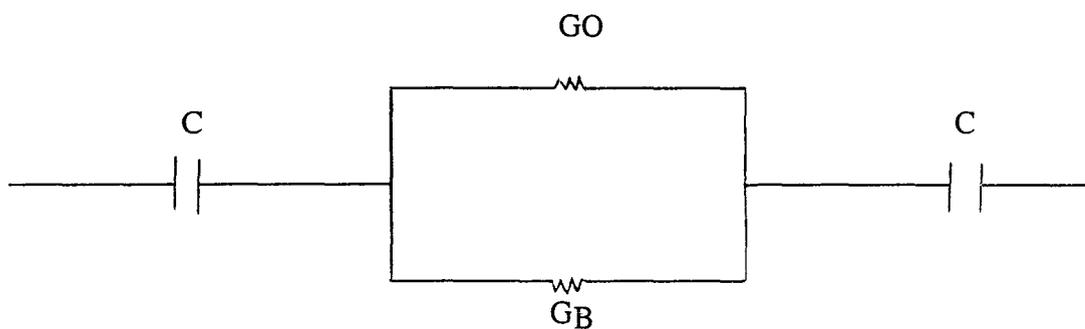


Figure 2: Schéma représentant le modèle du système impédancemétrique.

$G_O$ = Conductance du milieu de culture stérile.

$C$ = Capacitance de polarisation des électrodes.

$G_B$ = Variation de conductance du milieu de culture suite à la croissance microbienne.

Des précautions doivent néanmoins être prises dans le cas de dégagement de gaz acides autres que le CO<sub>2</sub>. L'hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) par exemple, va réagir avec le KOH et provoquer une variation négative de la conductance. La présence de substrat (thiosulfate de sodium par exemple) précurseur du sulfite (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) dans la formule du milieu, peut produire un signal précoce masquant ainsi la réponse microbienne (Firstenberg et Eden, 1984). Les cellules de mesure doivent être hermétiquement fermées pour éviter la fuite du CO<sub>2</sub> dégagé.

#### I-2 4 CHOIX DU PARAMETRE DE MESURE

Les trois paramètres électriques, capacitance, conductance et impédance peuvent être mesurés pour suivre les courbes d'évolution d'une culture microbienne. Mais le choix d'un paramètre à l'autre dépend de plusieurs facteurs dont le type d'appareil, le milieu et le microorganisme utilisés. Nous allons discuter ci-dessous, des facteurs de variation de ces trois paramètres.

La conductance d'un milieu dépend de la température alors que la capacitance est influencée par la variation de pH et/ou de la température. Certains polyions utilisés pour tamponner les milieux ont une influence prépondérante sur les variations de G alors que certaines souches microbiennes produisent des variations en capacité affectant très peu G. Ainsi le choix de C ou de G apparaît tout à fait empirique et dépendra du type de milieu, et du microorganisme. Henschke et Thomas (1988) ont observé que pour les mêmes milieux utilisés, l'impédance suivie à l'aide du Bactometer M123, augmentait pour certaines espèces de levures alors qu'elle baissait pour d'autres. La mesure de la capacitance était plus importante que la conductance. Strassburger et coll. (1991) ont confirmé l'hypothèse déduite de la formule générale de l'impédance selon laquelle, pour des courants de fréquences élevées (exemple 100 kHz), G est prédominante alors que pour des courants de faibles fréquences c'est la mesure de C qui est la plus appropriée.

Le Bactometer étant alimenté par un courant de 1,54 KHz, notre préférence s'est alors portée sur la mesure de C. Des expériences complémentaires permettrons d'élucider ce choix.

## I-2 5 BASES DE LA MESURE DE LA CAPACITANCE

La capacitance  $C$  est une constante caractéristique du condensateur qui est fonction de la constante diélectrique du milieu présent entre les deux électrodes, de la surface de ces électrodes et de leur distance l'une par rapport à l'autre (voir la formule ci-dessous).

$$C = (\epsilon / 4 \times \Pi) \times (A/d)$$

$A$  = surface des électrodes  
 $d$  = distance entre les électrodes  
 $\epsilon$  = constante diélectrique du milieu

Les métabolites ionisés libérés dans le milieu suite aux activités bactériennes, vont provoquer une augmentation de  $E$  ainsi que la "surface effective"  $A$  des électrodes. Ces phénomènes se traduiront en général par une augmentation de  $C$ . La capacitance dépend donc des modifications de la bicouche ionique au niveau des électrodes. Tout phénomène susceptible de produire la fixation de composés chargés sur les électrodes est déterminant pour la mesure de la capacitance.

Mais ces explications sont très simplistes car en réalité lors du développement microbien dans un milieu de culture, plusieurs paramètres interfèrent et conduisent à la modification de ce paramètre électrique. Les facteurs de variation de la capacitance ne sont pas aussi bien connus que ceux de la conductance (Richards et coll., 1978; Easter et Gibson, 1989). Ainsi des auteurs ont postulé que la mobilité ionique baisse l'impédance du milieu au niveau des électrodes alors qu'on s'attendait plutôt à une augmentation (Pless et coll., 1994).

## I-2 6 APPAREILLAGE

Quatre types d'appareils existent à ce jour et ils sont disponibles sur le marché Français: le Bactometer<sup>®</sup> Microbial Monitoring System (bioMérieux UK Ltd, Basingstoke) commercialisé par bio-Mérieux; le Malthus-AT Microbiological Growth Analyser (Radiometer, Crawley) commercialisé par Radiometer; le Rabbit (Don Whitley Scientific Ltd, Shipley) commercialisé par AES Laboratoire et le Bac Trac (Sy-Lab<sup>®</sup>, Austria), par FOSS Electric.

MATERIEL & METHODES

## II MATERIELS ET METHODES

### II-1 LES MATERIELS

#### II-1 1 LES MICROORGANISMES ANALYSES

##### II-1 1 1 Préparation des cultures pures pour l'impédancemétrie

Les essais ont porté sur cinquante six souches de collection de *Listeria* comprenant différents espèces et sérotypes (Tableau 1 et 2) ainsi que trente souches de la flore fréquemment associée à *Listeria* dans les prélèvements polymicrobiens (Tableau 3). A partir des tubes de conservation stockés au froid à +4°C, les souches sont revivifiées dans 0,4ml de bouillon nutritif (BN, Diagnostics Pasteur) et incubées pendant 24 heures à 37°C (ou 30°C pour les *Bacillus spp.*, *Yersinia spp.*, *Lactobacillus spp.*, *P. acidilactici* et *S. cerevisiae*). Les suspensions bactériennes obtenues sont isolées sur la gélose Trypticase Soy Agar (TSA, Merck), de Man Rogosa and Sharpe (MRS, Oxoid) pour *Lactobacillus spp* et Oxytetracycline Glucose Agar (OGA, Diagnostics Pasteur) pour *S. cerevisiae*. Après incubation à 37°C (ou 30°C), une colonie de 24 heures est reprise dans les bouillons Trypticase Soy Broth (TSB, Merck), OGA ou MRS.

Après incubation dans les mêmes conditions que précédemment, la biomasse obtenue est mesurée au spectrophotomètre (Spectronic 601, USA) à 620 nm. On estime à partir d'une droite d'étalonnage pré-établie, qu'une densité optique (DO) de 0,93 donne une population de *Listeria* d'environ  $5.10^8$  cellules/ml. Des dilutions décimales sont effectuées dans du Tryptone Sel (TS, AES Laboratoire) pour obtenir la concentration bactérienne désirée. Les vérifications sont faites par numération en double des dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$  sur les géloses Plate Count Agar (PCA, AES Laboratoire), OGA ou MRS selon la souche, à l'aide d'un enseigneur spiral. Les isolements sont incubés à 37°C (ou 30°C) pendant 24 à 48 heures.

##### II-1 1 2 Préparation des cultures pures pour la CPG

43 souches ont été examinées lors de cette expérience (Tableau 4). Elles sont composées par les espèces suivantes: *L. monocytogenes* (16 souches), *L. innocua* (21 souches), *L. welshimeri* (2 souches) et *L. seeligeri* (4 souches). Elles sont identifiées à partir des prélèvements d'environnement par les tests biochimiques.

Espèces	Sérotypes	Références
<i>L. monocytogenes</i>	1/2	SERMHA 164851
<i>L. monocytogenes</i>	1/2	SERMHA 166170
<i>L. monocytogenes</i>	1/2	SERMHA 167711
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	ATCC 86/201
<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	SERMHA 94/170884
<i>L. monocytogenes</i>	4b	ATCC 88/7137
<i>L. monocytogenes</i>	4b	ATCC 19115
<i>L. monocytogenes</i>	4b	SLCC 2375
<i>L. monocytogenes</i>	4b	SERMHA 94/209695
<i>L. monocytogenes</i>	4	SERMHA 166171 (2)
<i>L. monocytogenes</i>	4a	ATCC 19114
<i>L. monocytogenes</i>	4c	ATCC 19118
<i>L. monocytogenes</i>	4d	SERMHA 94/209694
<i>L. monocytogenes</i>	4d	ATCC 19117
<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	SERMHA 166171(2)
<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	SERMHA 94/171286
<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	SLCC 2755
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	SERMHA 93/15/269
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	ATCC 2725
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	ATCC 35152
<i>L. monocytogenes</i>	7	SLCC 2482
<i>L. monocytogenes</i>	3b	SLCC 2540
<i>L. monocytogenes</i>	3c	SLCC 2479
<i>L. monocytogenes</i>	SND	ATCC 2879
<i>L. monocytogenes</i>	SND	SERMHA 300260
<i>L. monocytogenes</i>	SND	SERMHA 166204
<i>L. monocytogenes</i>	SND	SERMHA 167757
<i>L. monocytogenes</i>	SND	SERMHA 94/213510

Tableau 1: Les souches de *L. monocytogenes* utilisées pendant les essais.

Légende:

SND= Serovars non désignés.

ATCC = American Type Culture Collection.

SLCC = Special *Listeria* culture collection.

SERMHA = Service de Microbiologie et Hygiène des Aliments.

Espèces	Sérotypes	Références
<i>L. ivanovii</i>	5	SERMHA 905398
<i>L. ivanovii</i>	5	ATCC 19119
<i>L. welshimeri</i>	SND	SERMHA 987
<i>L. welshimeri</i>	6b	ATCC 35897
<i>L. welshimeri</i>	6b	SERMHA 935331
<i>L. welshimeri</i>	SND	SERMHA 935335
<i>L. welshimeri</i>	6a	SERMHA 93/16/017
<i>L. seeligeri</i>	SND	NANTES 88/7136
<i>L. seeligeri</i>	1/2b	ATCC 35967
<i>L. innocua</i>	6b	ATCC 87/7137
<i>L. innocua</i>	6b	ATCC 87/5667
<i>L. innocua</i>	6b	ATCC 33091
<i>L. innocua</i>	6b	SERMHA 935327
<i>L. innocua</i>	6b	SERMHA 935545
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935328
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935329
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935330
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935333
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935334
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935338
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935339
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935545
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935546
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 935547
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 88/805/194
<i>L. innocua</i>	6a	SERMHA 93/18044
<i>L. innocua</i>	SND	SERMHA 94/213510
<i>L. grayi</i>		ATCC 19120

Tableau 2: Les autres espèces de *Listeria* utilisées pendant les essais.

Légende:

SND= Souches non désignées.

ATCC = American Type Culture Collection.

SERMHA = Service de Microbiologie et Hygiène des Aliments.

Espèces	Références
<i>Acinetobacter</i>	SERMHA
<i>Bacillus cereus</i>	SERMHA 528
<i>Bacillus cereus</i>	SERMHA 38/01/81
<i>Bacillus coagulans</i>	SERMHA
<i>Bacillus mycoïdes</i>	SERMHA
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	SERMHA 13-05/12/89
<i>Citrobacter freundii</i>	SERMHA
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10537
<i>Escherichia coli</i>	SERMHA
<i>Enterococcus durans</i>	SERMHA 504
<i>Enterococcus faecalis</i>	SERMHA 210867
<i>Enterococcus faecium</i>	SERMHA 502
<i>Enterobacter cloacae</i>	SERMHA
<i>Erysipelothrix</i>	SERMHA 424
<i>Lactobacillus brevis</i>	SERMHA
<i>Lactobacillus plantarum</i>	SERMHA 410-06/81
<i>Morganella morganii</i>	SERMHA
<i>Pediococcus acidilactici</i>	SERMHA
<i>Proteus mirabilis</i>	SERMHA 261-28/01/85
<i>Proteus vulgaris</i>	SERMHA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SERMHA
<i>Salmonella spp.</i>	SERMHA 135003
<i>Salmonella Typhi</i>	SERMHA
<i>Salmonella Typhimurium</i>	SERMHA 18-08/02/85
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53154
<i>Staphylococcus aureus</i>	CIP 53154
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SERMHA
<i>Yersinia enterocolitica</i> 0:3	SERMHA 227-06/81
<i>Yersinia enterocolitica</i>	SERMHA CR 14
<i>Yersinia intermedia</i>	SERMHA

Tableau 3: Flore associée utilisée pendant les essais.

Légende:

ATCC = American Type Culture Collection.

CIP = Collection de bactéries de l'Institut Pasteur de Paris.

SERMHA = Service de Microbiologie et Hygiène des Aliments.

Espèces analysées en CPG	Codes*	Origines
<i>L. monocytogenes</i>	1A	sol
<i>L. monocytogenes</i>	2A	caniveau
<i>L. monocytogenes</i>	3A	sol/mur
<i>L. monocytogenes</i>	4A	coupeuse
<i>L. monocytogenes</i>	5A	sol
<i>L. monocytogenes</i>	6A	sol/palette en bois
<i>L. monocytogenes</i>	7A	soufflet
<i>L. monocytogenes</i>	8A	patins
<i>L. monocytogenes</i>	9A	résidus sur filtre
<i>L. monocytogenes</i>	10A	sol/égoût
<i>L. monocytogenes</i>	11A	racleur
<i>L. monocytogenes</i>	12F	sol
<i>L. monocytogenes</i>	13F	plateau balance
<i>L. monocytogenes</i>	14F	eau stagnante
<i>L. monocytogenes</i>	15F	sol/résidus
<i>L. monocytogenes</i>	16F	goutière caniveau
<i>L. innocua</i>	17A	bouton boudineuse
<i>L. innocua</i>	18A	tank
<i>L. innocua</i>	19A	surface moule
<i>L. innocua</i>	20A	trémie
<i>L. innocua</i>	21A	accident de surface
<i>L. innocua</i>	22A	sol de conditionneuse
<i>L. innocua</i>	23A	rebord boudineuse
<i>L. innocua</i>	24A	bouche aération
<i>L. innocua</i>	25A	tapis
<i>L. innocua</i>	26A	sol
<i>L. innocua</i>	27F	paroi caisse
<i>L. innocua</i>	28F	sol chambre à 4°C
<i>L. innocua</i>	29F	table filetage
<i>L. innocua</i>	30F	pas de chambre à 4°C
<i>L. innocua</i>	31F	égoût chambre à 4°C
<i>L. innocua</i>	32F	eau stagnante
<i>L. innocua</i>	33F	sol/eau
<i>L. innocua</i>	34F	sol/résidus
<i>L. innocua</i>	35F	sol/résidus
<i>L. innocua</i>	36G	sol plonge
<i>L. innocua</i>	37E	caniveau
<i>L. seeligeri</i>	38A	sol chambre à 4°C
<i>L. seeligeri</i>	39F	dessous plaque filetage
<i>L. seeligeri</i>	40F	eau stagnante
<i>L. seeligeri</i>	41F	sol/eau
<i>L. welshimeri</i>	42F	couteaux sales
<i>L. welshimeri</i>	43F	couteaux sales

Tableau 4: Les souches de *Listeria* isolées dans l'environnement industriel et analysées par la CPG.

Légende: \* A= Usine A; F= Usine F; E= Usine E; G= Usine G.

### II-1 1 3 Préparation des cultures mixtes

Quatre mélanges bactériens ont été préparés avec 9 souches comprenant aussi bien des bactéries pathogènes que des bactéries inoffensives de la flore de contamination. A l'exception du témoin, chaque mélange est testé en présence d'une souche de *Listeria*. 1ml de chaque suspension bactérienne obtenue dans les mêmes conditions que précédemment, est transféré dans un tube stérile. La concentration de chaque bactérie est estimée à  $10^7$  cellules/ml de mélange. Dans le cas du témoin, 1ml de TS est ajouté afin d'ajuster sa dilution à celle des essais sur *Listeria*. Ce sont:

Témoin: *E. faecalis* 210867 + *C. aquaticum* 13-05/12/89 + *B. cereus* 528 + *L. brevis* + *Salm. Typhi* + *St. aureus* CIP 53154 + *P. mirabilis* 261-28/01/85 + *E. coli* 10537 + *Y. enterocolitica* 0:3 227-06/81

Mélange 1: Témoin + *L. monocytogenes* 4b 19115

Mélange 2: Témoin + *L. monocytogenes* 1/2c 86201

Mélange 3: Témoin + *L. innocua* 6b 87/5667

Mélange 4: Témoin + *L. welshimeri* 987

### II-1 1 4 Ensemencement des modules de capacitance

Des cupules de module à usage unique sont ensemencées en double avec 0,1ml des dilutions correspondantes à environ  $10^5$ - $10^6$  cellules/ml auquel nous ajoutons 0,9ml de milieu à tester. Puis les modules sont incubés dans le Bactometer à 37°C pendant 48 heures. Après enregistrement des données, nous isolons le contenu des cupules sur les géloses PCA, OGA ou MRS en fonction de la bactérie étudiée (dans le cas des souches pures) et Palcam (dans le cas des cultures mixtes) pour vérifier la viabilité des cultures. Les isollements sont incubés à 37°C ou 30°C pendant 48 heures. Les valeurs des variables mesurées (TD et PVC) sont reportées dans les tableaux par leur moyenne suivie de l'écart-type lorsque celui-ci n'est pas nul.

### II-1 1 5 Ensemencement des modules de conductance

Pour la mesure de la conductance, les cellules de mesure sont ensemencées en triple avec 0,1ml d'inoculum à la dilution  $10^{-1}$  auquel 10 ml de milieu testé est ajouté. La concentration bactérienne par cellule de mesure est estimée alors à  $10^5$  cfu/ml.

Dans le cas de la conductance indirecte, les cellules de mesure sontensemencées en triple avec 0,3ml d'inoculum à la dilution  $10^{-2}$  auquel 2,5 ml de milieu testé est ajouté. La concentration bactérienne par cellule de mesure est également estimée à  $10^5$  cfu/ml. Un tube contenant 1,2ml d'une solution de KOH à 0,6% est précautionneusement déposé à l'intérieur de ces cellules de mesure puis les électrodes sont adaptées.

Dans les deux cas, un témoin milieu est réalisé puis les échantillons sont incubés dans le Rabbit à 37°C pendant 24 heures. Le paramètre suivi est l'aspect des courbes de *Listeria*.

## II-1 1 6 Les dénombrements microbiens

- **Dénombrement des germes aérobies mésophiles:** La numération des germes aérobies mésophiles est effectuée par la technique du spiral sur la gélose PCA précoulée prête à l'emploi (Diagnostics Pasteur). Les boîtesensemencées sont incubées à 30°C et lues au bout de 48 heures sur un compteur de colonies (Type 114201 Schneider & Co., Zurich).

- **Dénombrement des coliformes:** La gélose Violet Red Bile Lactose (VRBL) utilisée est préparée suivant les instructions du fabricant (Bio Mérieux) à partir de la base déshydratée puis coulée dans des boîtes de Petri. Desensemencements en surface sont réalisés à l'aide d'un ensemenceur spiral puis recouverts par une couche du milieu fondu maintenu en surfusion à 45°C (N° 390 06074, 0,018 m<sup>3</sup>, 90°C Astel Sa., France). Ils sont incubés à 30°C et les colonies roses de diamètre supérieur à 0,5 mm sont dénombrées au bout de 24 heures.

- **Numération des levures et des moisissures:** Après fusion de la gélose OGA (Diagnostic Pasteur), 100mg/l d'hydrochlorure d'oxytétracycline (Laboratoires Pfizer) sont ajoutés lorsque le milieu est refroidi à 45°C. Il est coulé dans des boîtes de Petri puisensemencé à l'aide d'un ensemenceur spiral. Les lectures sont effectuées après incubation à 25°C pendant 5 jours.

- **Recherche des Salmonelles:** 0,1ml d'échantillon contenu dans le tryptone sel, est transféré dans 0,9ml d'eau peptonée tamponnée (Diagnostics Pasteur). Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures. 0,1ml de ce pré-enrichissement est repris dans 10ml de milieu Rappaport (Unipath) et incubé à 37°C pendant 24 heures alors que 2ml sont

transférés dans 20ml de milieu Selenite (Diagnostic Pasteur) et incubés à 42°C également en 24 heures. Ces subcultures sont par la suite enrichies dans 10ml de milieu M (Difco) avec 0,5ml de chacun des milieux Rappaport et Selenite. Après 4 heures d'incubation la mise en évidence des antigènes des *Salmonella* est faite suivant le protocole préconisé (Transia, référence Afnor Tra. 02/4-11/93).

## II-1 2 LES MILIEUX DE CULTURE

La composition des milieux cités se trouve en Annexe. Pour des raisons de confidentialité, seule la composition du milieu AES ne figure pas en Annexe.

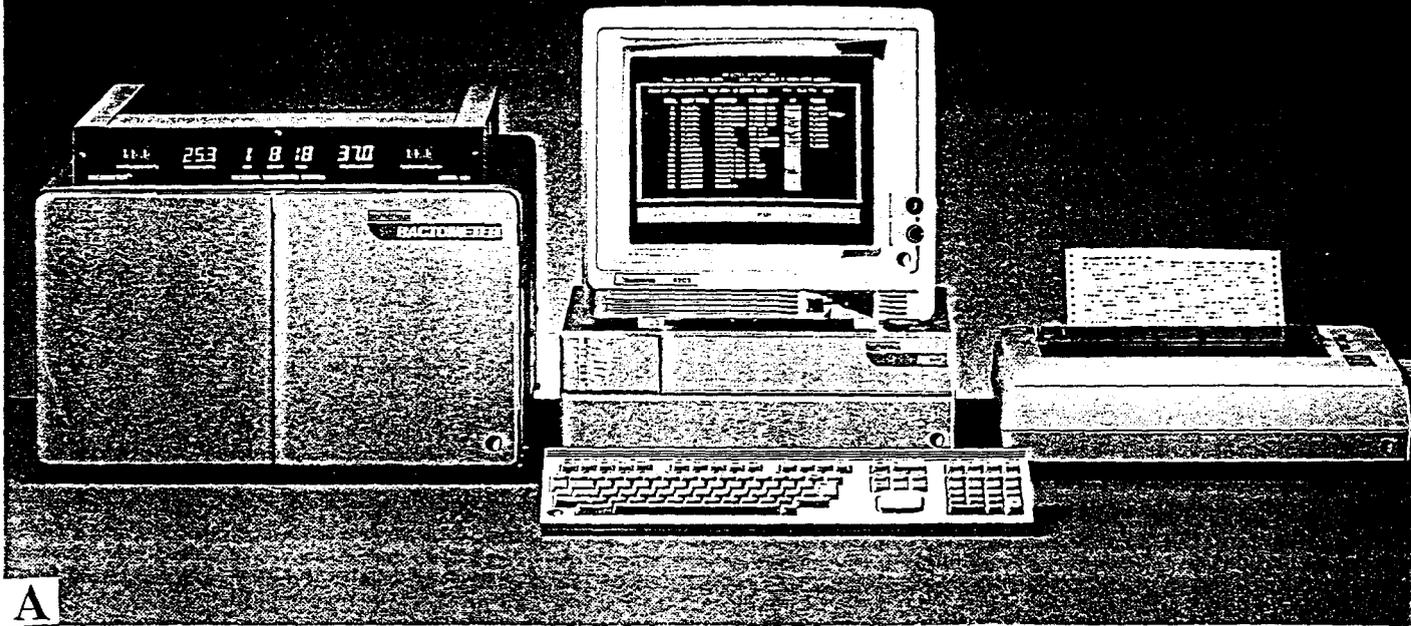
## II-1 3 LES APPAREILS UTILISES

### II-1 3 1 L'ensemenceur spiral

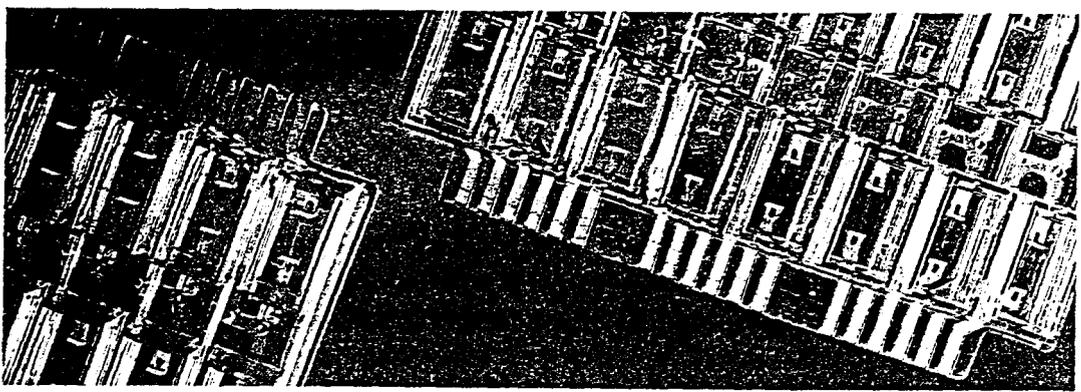
L'ensemencement par "spiral " est une méthode normalisée par l'AFNOR (NF V08 100). Les numérations microbiennes ont été effectuées par un ensemenceur "spiral" (Modèle DS, N°484, Interscience). L'appareil muni d'une micropompe doseuse dépose avec précision, par l'intermédiaire du stylet, 50µl de l'échantillon liquide à la surface d'un milieu solide coulé en boîte de Petri placée sur un plateau tournant. Le stylet se déplace du centre vers la périphérie de la boîte, décrivant une spirale d'Archimède le long de laquelle il dépose régulièrement et de façon décroissante le volume faible et calibré de 50µl. Une grille calibrée sert de support aux numérations.

### II-1 3 2 Le Bactometer

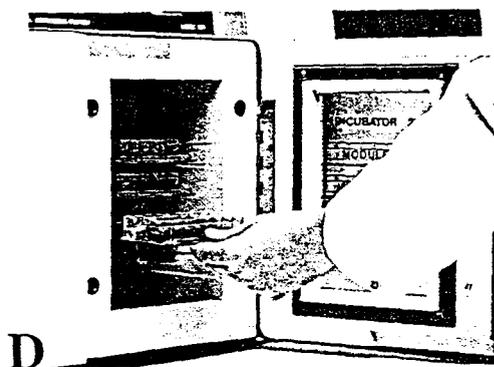
L'appareil utilisé pour la mesure de la capacitance au cours de notre étude est le Bactometer® M123 (Figure 3). C'est le seul instrument à l'heure actuelle proposé pour mesurer aussi bien l'impédance, la conductance que la capacitance. Le système peut contenir 4 unités autonomes appelées BPU. Chaque BPU comprend 2 chambres d'incubation où la température est homogénéisée par un système d'air pulsé et peut être fixée mécaniquement entre 8°C et 55°C. La régulation se fait par effet Peltier. La précision de la fixation des températures est de  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  compte tenu de l'extrême importance de ce paramètre sur la reproductibilité des résultats.



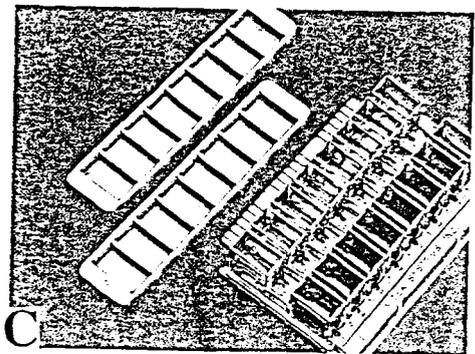
A



B



D



C

Figure 3 : Présentation du BACTOMETER M123 et incubation d'un module ensemencé.

Légende: A= Ensemble Bactometer Processing Unit  
d'une cupule

C= Module ensemencé

B= Configuration  
D= Insertion d'un

module dans la chambre d'incubation

Chaque chambre d'incubation peut contenir 4 modules à usage unique de 16 cupules soient 512 échantillons à analyser simultanément pour 4 BPU. Le SERMHA dispose de 2 BPU. Au fond de chaque cuvette de mesure se trouvent deux électrodes en acier inoxydable qui sont connectées au circuit par l'intermédiaire du module.

Les lectures sont effectuées toutes les 6 minutes pour chaque cupule qu'il est possible de visualiser sur un terminal couleur. La mesure de la capacitance permet d'obtenir une courbe à partir de laquelle on obtient le temps de détection (TD) déterminé automatiquement par un algorithme. Le pourcentage de variation de capacitance (PVC) est calculé manuellement sur l'axe des ordonnées à partir de la différence entre les valeurs de la ligne de base et la hauteur du pic. Il est exprimé dans une unité arbitraire de la capacitance fixée par le constructeur. L'ensemble du système peut fonctionner en continu pendant 100 heures. Au delà, il faut relancer les analyses. Un ordinateur (NC2) exerce un contrôle permanent des opérations en cours, mémorise les valeurs, les traite et interprète les résultats. Il sauvegarde automatiquement les données en cours et permet également son archivage sur disquette. Une imprimante (Fujitsu, DX 2100) permet d'éditer en permanence les résultats.

### **II-1 3 3 Le Rabbit**

La mesure de la conductance directe et de la conductance indirecte du milieu de culture s'est effectuée avec le Rabbit à l'Université de Technologie de Compiègne (DPB, Division des Procédés Biotechnologiques). L'unité de base du Rabbit est un ordinateur spécifique (dont les résultats sont exportables sur un PC) et un module d'incubation de 32 postes. Le système est totalement multitâches et peut, par exemple, être consulté à l'écran pour des tests en cours ou achevés et éditer des résultats. 16 modules indépendants peuvent être connectés à l'unité de base et analyser simultanément jusqu'à 512 échantillons. Le laboratoire DPB dispose de 2 blocs, soit 64 cellules de mesure.

La température de chacun des modules peut varier de +4°C à 55°C. Afin de maintenir stables les températures de mesure, les modules ont été conçus en fonte d'aluminium. Leur chauffage est électrique et leur contrôle électronique. L'ensemble loge dans un module en polyuréthane permettant une excellente isolation. Le lancement des analyses se fait par sélection au préalable de la température puis attribution d'un code qui définit entre autre, le nombre de minutes qui vont s'écouler entre deux mesures. La durée totale de l'analyse est également programmée (99 heures au maximum). La conductance mesurée au cours du temps est exprimée en  $\mu\text{S}$ .

### II-1 3 4 Le Chromatographe HPLC

- **Présentation du chromatographe:** La HPLC permet la séparation d'un ou plusieurs composés d'un mélange pour permettre leur identification et leur quantification. Le système utilisé est une chaîne HPLC (Kontron 360) avec une colonne échangeuse d'ions  $H^+$  (OACK, Merck). Ce type de colonne possède une haute performance désignée pour la séparation des molécules chargées comprenant: les acides organiques, les composés carbonés dont quelques alcools et certains ions inorganiques. Le passage des échantillons est assuré par un passeur automatique (Autosampler Kontron 360). La détection se fait par un spectrophotomètre UV (Kontron 430) à la longueur d'onde  $\lambda$  égale à 210 nm et par un réfractomètre (LKB 2142 ou Kontron 475). L'ensemble de la chaîne HPLC, interfacé à un ordinateur PC (Personal computer) est piloté par le logiciel Kontron Data System 450 version 3.30 et installé à l'USTL au sein de l'unité de microbiologie. L'élution des composés est réalisée dans les conditions suivantes:

-éluant pour la phase mobile:  $H_2SO_4$  à 0,02N

-température: 70°C

-débit: 0,4ml/minutes

-volume injecté: 20 $\mu$ l

- **Calibration de la colonne:** Avant de passer les échantillons à analyser, une calibration de la colonne est effectuée par passage d'étalons dont la composition et la concentration sont connues.

### II-1 3 5 Le Chromatographe CPG

- **Présentation du chromatographe:** Nous avons utilisé un chromatographe Hewlett Packard modèle 5890 série II (Hewlett Packard Company, Amsterdam). Il est équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, d'une colonne capillaire de silice non polaire de dimension 25m $\times$ 0,2 $\times$ 0,33mm dont la phase stationnaire contient 5% de méthyl phényl silicone (HP, USA) et d'un passeur automatique d'échantillons (HP, USA). L'hydrogène C (Air Liquide, France) est utilisé comme gaz vecteur, l'azote (Air Liquide, France) sert de gaz auxiliaire (ou neutre) et l'air (Air Liquide, France) permet d'alimenter la flamme. Un régulateur de pression maintient une pression constante et uniforme à l'entrée de la colonne avec un débit de 30ml/min. La pression en tête de colonne est maintenue à 70 kPa afin d'obtenir l'élution du pic du solvant à un temps de rétention (RT) de 1,6min.

Sa température initiale est de 170°C et augmente de 5°C/min jusqu'à 270°C en 24min. La température de l'injecteur est fixée à 250°C et celle du détecteur à 300°C pour assurer une meilleure résolution. Le volume injecté est de 1ml. Le temps d'analyse est de 25min par échantillon. Un intégrateur (HP 3369II) enregistre les chromatogrammes des différents esters méthylés. Il est relié à un ordinateur (MIS) qui permet le traitement des données. Ce système analyse les profils des acides gras à chaîne carbonée de 9 à 20 atomes de carbone. La version 3.8 de la banque de données TSBA (HP, USA) spécifique des bactéries anaérobies est exploitée à cet effet. Elle est constituée par le profil moyen des acides gras de différentes souches d'une même espèce.

- **Calibration de la colonne:** Le système MIS (Microbial Identification System) utilise une solution de calibration constituée par un mélange de 5 acides gras saturés à chaîne linéaire non ramifiée de 9 à 20 atomes de carbone et de concentration connue (Hewlett Packard Rev. B, USA). Le chromatogramme obtenu permet d'apprécier d'une part l'état de la colonne et d'autre part l'erreur commise sur la mesure des paramètres fixés. L'analyse des échantillons se fait à la suite d'une calibration, puis du passage successif du témoin réactif 3 et du témoin d'extraction (sans culture).

## II-2 LES METHODES

### II-2 1 FORMULATION DU MILIEU

#### II-2 1 1 La base

Six milieux ont été utilisés pour ces expériences (Annexe): AC, ASLM, MVJ, Oxford, Oxford modifié (OXB) et Palcam. Nous avons choisi de travailler sur des milieux liquides pour faciliter les manipulations et gagner ainsi du temps en évitant la préparation préalable des modules. Les essais ont porté dans un premier temps sur les milieux contenant leur supplément sélectif et dans un second temps sur les milieux sans leur supplément sélectif. En fonction des observations, les expériences ont été poursuivies avec les bases des milieux Oxford, MVJ et Palcam sans chlorure de lithium pour finalement retenir la formule du milieu Oxford sans chlorure de lithium. Dix souches de *Listeria* référencées ont servi à ces expériences.

## II-2 1 2 Le supplément sélectif

Les paramètres à étudier (Tableau 5) ont été sélectionnés à partir de nos expériences et des données bibliographiques sur leur tolérance par *Listeria* ainsi que leur capacité à inhiber les cellules microbiennes non désirées. Le plan d'expériences employé a été appliqué à la souche test *L. monocytogenes* 4b 19115 de la collection Américaine ATCC et également à *E. faecalis* 210867 de la collection du SERMHA, qui est une bactérie très compétitive vis à vis de *Listeria* lors des enrichissements et des isollements sélectifs. Huit souches de *Listeria*, seize souches de la flore annexe et deux mélanges ont par la suite été utilisés pour vérifier les conclusions partielles dégagées.

Les bouillons de culture en milieu TSB, préparés selon le protocole décrit au paragraphe II-1 1, sont centrifugés à 3500 trs/min pendant 15 min (Megafuge 1.0 Heraeus). Les culots bactériens obtenus sont lavés deux fois avec 10ml d'eau physiologique à 8,5‰, puis repris dans 2ml de cette solution. Des dilutions décimales sont effectuées dans l'eau physiologique pour obtenir la concentration bactérienne désirée. Les vérifications sont faites par numération sur la gélose PCA à l'aide d'un ensemencement spiral.

Les réponses mesurées sont les Temps de Détection (TD). Le domaine d'étude est défini en précisant pour chaque facteur, un niveau bas noté (-) et un niveau haut noté (+). Nous avons employé un plan de base complet  $2^3$  construit à partir d'un plan d'expériences fractionnaires  $2^{7-4}$ . Les facteurs principaux étudiés sont: la proflavine, la ceftazidime et la nitrofurantoïne. Les deux premiers composés se dissolvent facilement dans l'eau. La nitrofurantoïne est dissoute dans une solution de N,N-diméthylformamide (DMF, Sigma) diluée au 1/10 (Volume/volume). Les solutions concentrées d'antibiotiques sont stérilisées par filtration sur une membrane de 0,2µm de diamètre (Millipore S.A.) puis conservées à 4°C avant leur utilisation. La durée de stockage est de 15 jours. Les quatre interactions issues de ce plan sont prévues pour étudier les facteurs supplémentaires.

Par crainte que le domaine expérimental défini ne couvre la solution à notre problème et que les facteurs abandonnés ne soient légèrement influents, nous les avons intégré dans l'erreur expérimentale et randomisé les essais. La randomisation s'est faite par tirage au sort exhaustif des numéros des essais et correspond à leur ordre de passage. Ces facteurs supplémentaires furent aliasés et leur présentation selon la notation décrite par Box et coll. (1971) est la suivante:

Facteurs étudiés	Références bibliographiques
Nitrofurantoïne (Nitro)	Knudtson L. M. and Hartman P. A. 1993. J. Food. Prot. 56, 6:489-492
Proflavine (Prof)	Hanckok I. et coll. 1993. Lett. Appl. Microbiol. 16: 311-314
Ceftazidime (Ceft)	Van Netten et coll. 1989. Lett. Appl. Microbiol. 7: 17-21.
LiCl	Fraser J. A. and Sperber W. H. 1988. J. Food. Prot. 51, 10: 762-765
Bleu de méthylène (BM)	Despieres M. 1971. Ann. Inst. Past. 121: 493-501
Rhamnose (Rham)	Despieres M. 1971. Ann. Inst. Past. 121: 493-501
$\alpha$ -Me-mannoside ( $\alpha$ -Me-man)	Rocourt J. 1983. Ann. Inst. Past. 134A: 65-71

Tableau 5: Les facteurs étudiés dans le plan d'expériences et leurs références bibliographiques.

$$4 = 123$$

$$5 = 12$$

$$6 = 23$$

$$7 = 13$$

Si l'on néglige les interactions d'ordre supérieur à deux, le calcul des contrastes donne:

$$I_1 = 1+25+37+46$$

$$I_2 = 2+15+36+47$$

$$I_3 = 3+17+26+45$$

$$I_4 = 4+16+27+35$$

$$I_5 = 5+12+34+67$$

$$I_6 = 6+14+23+57$$

$$I_7 = 7+13+24+56$$

$$I_M = I + 12 + 13 + 23$$

Pour savoir si un effet est significatif ou non, on compare l'erreur commise  $\Delta E$  sur la détermination de l'effet E à l'effet lui-même.

si  $E \gg \Delta E$  l'effet est influent

si  $E << \Delta E$  l'effet est non influent

$\Delta E = \sigma / \sqrt{n}$   $\sigma =$  écart type des réponses sur la mesure de TD

$n =$  nombre d'essais effectués pour la mesure de l'effet

Si nous retenons que l'erreur expérimentale ( $\sigma$ ) est égale à  $\pm 2$  heures sur la réponse, le plan de base faisant intervenir 8 essais l'erreur sur les effets ( $\Delta E$ ) devient:

$$\Delta E = \pm 2 / \sqrt{8} = \pm 0,7$$

Le modèle mathématique associé à ce plan d'expériences prend pour hypothèse de base la linéarité et l'additivité des facteurs. C'est un polynôme de premier degré par rapport à chacun des facteurs pris indépendamment et dont les coefficients expriment: la moyenne, les effets principaux et les interactions. Sa formule générale est de la forme suivante:

$$y = \mu + E x$$

y : réponse mesurée

$\mu$  : moyenne des réponses mesurées

E : effet du facteur étudié

x : facteur étudié

Pour vérifier la validité de ce modèle, nous avons répété quatre fois les mêmes mesures au centre du domaine expérimental.

## II-2 2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION

### II-2 2 1 Rôle du fer dans le milieu de base

Nous avons testé trois différents composés contenant du fer. La composition de la base du milieu préparé est la suivante: Peptone pancréatique de soja 23g/l, Amidon 1g/l, NaCl 5g/l, et Esculine 1g/l. Le pH est ajusté à 7,02 avec 1ml de soude à 0,4%, puis le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 min. Chacune des solutions concentrées de Citrate de fer ammoniacal (0,5g/l), de sulfate ferrique d'ammonium (1,8g/l) et de sulfate ferreux (0,5g/l) est ajoutée extemporanément à 50ml de milieu pour obtenir une concentration commune de 1,8mM. Un flacon de 50ml de milieu sans fer a servi de témoin aux essais.

Une souche de *L. monocytogenes* 4b 19115 est enrichie pendant 24 heures à 37°C dans du TSB. La culture bactérienne obtenue est centrifugée à 3500 trs/min pendant 15min (Megafuge 1.0 Heraeus). Le culot bactérien est lavé deux fois avec 10ml d'eau physiologique à 8,5‰ pour éliminer toute trace de fer apportée par le milieu. Il est repris dans 2ml de cette solution. Des dilutions décimales sont effectuées dans l'eau physiologique pour obtenir la concentration bactérienne désirée. Les vérifications sont faites par numération sur la gélose PCA à l'aide d'un ensemencement spiral. Les cupules sont ensemencées avec la dilution permettant d'avoir  $10^4$  cellules/ml de cupule, puis 0,9ml de milieu est ajouté. Les modules sont incubés dans le Bactometer à 37°C pendant 20 heures.

### II-2 2 2 Le pH initial du milieu

1 litre de milieu Oxford sans chlorure de lithium de pH initial 6,78 (pH Meter 761 Calimatic) est préparé et reparti à raison de 50ml par flacon de 125ml. Ces milieux sont

divisés en deux lots de 10 et 8 flacons. Le premier lot a servi à mesurer les pH croissants (par rapport au pH initial) en ajoutant des volumes croissants d'une solution molaire de NaOH. Alors que le deuxième lot a servi à mesurer les pH décroissants en ajoutant des volumes croissants d'une solution molaire de HCl (Tableau 6). Ces milieux ainsi préparés sont autoclavés à 121°C pendant 15min. Après refroidissement, le supplément sélectif est ajouté aux milieux. Des cupules sont ensemencées en double avec 0,1ml d'une suspension de *L. monocytogenes* 4b 19115 contenant environ  $6.10^6$  cellules/ml puis 0,9ml du milieu testé est ajouté. Les essais sont effectués en double et les modules sont incubés au Bactometer pendant 48 heures puis le contenu des cupules est isolé sur de la gélose PCA.

Les variations de capacitance, de conductance, des temps de détection ainsi que l'hydrolyse de l'esculine en fonction du pH des milieux ont été suivis. Pour vérifier la reproductivité des résultats, les essais correspondants à la plage de pH comprise entre 5,99 et 7,46 ont été repris dans les mêmes conditions que précédemment car les variations sont intéressantes dans cet intervalle. En mesurant seulement la capacitance et le temps de détection, la croissance de *Listeria* en fonction du pH des milieux a été suivie

### II-2 2 3 Origine des variations de capacitance

Une culture de 48 heures sur la gélose PCA de *L. monocytogenes* 4b 19115 est repiquée (1 colonie) dans 10 ml de milieu TSBYE. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures. Des dilutions décimales sont faites dans 9 ml d'eau physiologique puis les numérations sont effectuées en double sur la gélose PCA avec les dilutions  $10^{-5}$  et  $10^{-6}$ . Les isolements sont incubés à 37°C pendant 48 heures. Des cupules sont ensemencées en double avec 0,1ml de suspension bactérienne des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  auquel 0,9ml du milieu sélectif impédancemétrique est ajouté. Le module est incubé dans le Bactometer à 37°C pendant 24 heures. Après enregistrement des données, les cultures sont pipetées dans des tubes 16x95 mm (OSI) puis centrifugées à 3500 trs/min pendant 15 min pour éliminer les cellules bactériennes ainsi que la présence éventuelle de grosses particules. Les surnageants sont récupérés stérilement puis centrifugés une deuxième fois dans les mêmes conditions afin d'obtenir des liquides limpides. Les surnageants ainsi obtenus sont filtrés sur des membranes 0,2µm et conservés à +4°C dans des tubes 16x95mm. Les échantillons sont passés en HPLC dans les 24 heures.

pH	Volume NaOH (1mol/l)	Volume HCl (1mol/l)
	ml	ml
8,18	0,8	0
7,79	0,6	0
7,64	0,5	0
7,46	0,4	0
7,40	0,35	0
7,30	0,30	0
7,24	0,25	0
7,14	0,2	0
7,09	0,15	0
6,95	0,1	0
6,78	0	0
6,37	0	0,2
6,22	0	0,25
5,99	0	0,3
5,80	0	0,4
5,45	0	0,5
5,30	0	0,6
5	0	0,7
4,79	0	0,8

Tableau 6: Variation du pH des milieux sélectifs Oxford sans chlorure de lithium en fonction des volumes de NaOH ou HCl ajoutés.

#### **II-2 2 4 Détection de *Listeria* en conductance**

Le but de cette étude était d'évaluer la possibilité d'utiliser notre milieu (appelé ici Milieu Pasteur) adapté à la mesure de capacitance, pour détecter *Listeria* en conductance. Pour cela, une étude comparative a été effectuée sur le Milieu Pasteur et le milieu AES recommandé en conductance afin de valider nos résultats. Par ailleurs nous avons également vérifié la possibilité d'appliquer la technique de l'impédancemétrie indirecte à la détection de *Listeria* en culture dans le Milieu Pasteur. 8 souches de *Listeria* préparées selon les conditions décrite en paragraphe II-1 1 ont servi à cette étude. Seul l'aspect des courbes a été analysé.

#### **II-2 2 5 Détection de *Listeria* en présence d'oxyrase**

L'oxyrase provient de la fragmentation de la membrane cytoplasmique de *E. coli* après centrifugation d'une culture de 24 heures. Elle est fournie par Oxyrase (Inc., Ashland, OH) dans des conditionnements stériles sous forme congelée. Nous avons placé le produit préalablement conservé à  $-15^{\circ}$ , dans une chambre froide à  $+4^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. Après avoir minutieusement homogénéisé le produit décongelé sans introduire d'oxygène, nous avons déposé 10ml dans 100ml de milieu Oxford sans chlorure de lithium supplémentés avec les antibiotiques. Le milieu sans oxyrase a servi de témoin aux essais. Le pH est ajusté à  $7,01 \pm 0,1$  avec une solution molaire de soude. Treize souches de *Listeria* ont été préparées pour cette expérience. Après avoirensemencé les cupules, les milieux sont ajoutés et les modules incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 48 heures dans le Bactometer. Les temps de détection et les variations de capacitance ont été suivis.

#### **II-2 2 6 Calcul des temps de génération (tg) de *L. monocytogenes* 4b 19115 dans les milieux LEB, UVMI et FRASER AU 1/2**

Nous avons préparé les bouillons LEB (Merck), UVMI (Oxoid) et FRASER AU 1/2 (Oxoid) suivant les instructions du fabricant (Annexe). Les solutions de contamination ont été préparées comme au paragraphe II-1 1 mais avec des dilutions de 1/2 à 1/2 pour avoir le maximum de points. Les cupules sontensemencées en double avec 0,1ml de ces suspensions auquel 0,9ml de milieu à tester est ajouté. Les modules sont incubés au Bactometer à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures. La numération sur la gélose PCA des solutions contaminantes permet d'obtenir les concentrations bactériennes initiales ( $N_0$ ) dans chacune des cupules.

En traçant la courbe  $\log N_0$  en fonction des TD on obtient suivant l'analyse de la regression linéaire, une droite dont l'équation générale est:

$$\log N_0 = A - B \cdot TD$$

$N_0$  = concentrations bactériennes initiales  
 A = ordonnée à l'origine  
 B = pente de la droite  
 TD = Temps de détection

A partir de cette droite, le tg est calculé suivant la formule ci-dessous utilisée par Firstenberg et Eden (1984):

$$tg = \log 2 / B$$

tg = temps de génération  
 B = pente de la droite

## II-2 2 7 Seuil de détection et estimation du temps d'enrichissement des échantillons à analyser

Des tubes de 9ml des milieux LEB, UVMI et FRASER AU 1/2 sont préparés et contaminés avec 1ml de la dilution contenant  $10^5$  *L. monocytogenes* 4b 19115/ml. Ces ensemencements sont incubés à 37°C pendant 1 heure. Dix dénombrements sont faits sur la gélose PCA au cours de ce temps à intervalles réguliers de 10min. Les isolements sont mis à incuber à 37°C pendant 48 heures. Le temps de latence  $T_L$  est déduit à partir de l'observation conjointe des TD (résultats précédants) et le début de doublement de la population de contaminant. Le seuil de détection est représenté simplement par l'ordonnée à l'origine  $A'$  de la droite (Firstenberg et Eden, 1984):

$$\log N_0 = A' - B'(TD - T_L) \text{ ou sous forme simplifiée } \log N_0 = A - B TD$$

$$A' = A - B' T_L$$

$$B' = B$$

Connaissant  $A'$ , nous avons estimé le temps d'incubation nécessaire pour atteindre ce seuil à partir d'un échantillon contaminé initialement avec 1 *Listeria*/ml. La formule utilisée est la suivante:

$$N(TD) = N_0 \times 2^n = N_0 \cdot 2^{t/tg} \quad \text{par déduction} \quad t = \log N \times tg / \log 2$$

$N_0$  = concentration bactérienne initiale

$t$  = temps d'incubation de l'échantillon

$N$  = concentration bactérienne à l'instant TD

$n$  = nombre de cycles de doublement de la population initiale

## II-2 3 VALIDATION DE LA METHODE MISE AU POINT

### II-2 3 1 Sur les cultures pures

La sélectivité du milieu a été testée sur cinquante six souches pures de *Listeria* et trente souches constituées par la flore annexe (Tableau 1, 2, 3). Le milieu sélectif est constitué par l'Oxford sans chlorure de lithium contenant 20mg/l de Cefotaxime et 21mg/l de Proflavine et dont le pH est ajusté à  $7,01 \pm 0,1$ . Les temps de détection, les pourcentages de variation de capacitance et l'aspect des courbes sont les variables mesurées. La vérification des réponses est faite par isolement sur les géloses appropriées.

### II-2 3 2 Sur les cultures mixtes

La spécificité du milieu a été validée sur quatre mélanges comprenant chacun neuf flores annexes et une espèce de *Listeria* (voir les préparations en II-1 1). Les conditions d'ensemencement, d'incubation des modules ainsi que les variables suivies, sont les mêmes que précédemment. Pour les mélanges, la vérification des cultures est faite sur la gélose Palcam.

### II-2 3 3 Sur les prélèvements d'environnement

#### a) Méthode de prélèvement des échantillons

Une première série de 248 échantillons sont analysés en parallèle par les méthodes AFNOR V08 055 et impédancemétrie. Ils proviennent de six usines différentes: A (41 échantillons), B (20 échantillons), C (12 échantillons), D (4 échantillons), E (86 échantillons), F (37 échantillons) et d'un hypermarché (48 échantillons) spécialisé dans la distribution collective. Les prélèvements en provenance des usines sont effectués stérilement par écouvillonnage (Copan, Italie) sur une surface de  $100 \text{ cm}^2$  standardisée

avec un gabarit en acier de 10 cm de côté. Entre chaque prélèvement, le gabarit est stérilisé par de l'alcool à 70°. Les écouvillons sont déposés dans les tubes (Copan, Italie) contenant 0,5ml de diluant. Dans le cas de l'hypermarché, les prélèvements sont faits à l'aide d'éponges de dimension 5x4x3 cm imbibées au préalable avec 10ml de solution de diluant.

Une deuxième série de 95 échantillons sont analysés par la méthode AFNOR V08 055 pour la recherche de *Listeria* ainsi que pour le dénombrement des indicateurs. Les échantillons proviennent de quatre usines: A (20 échantillons), C (25 échantillons), F (25 échantillons) et G (25 échantillons). Les prélèvements sont effectués avec des écouvillons comme préalablement mais en double. L'un a servi pour la recherche de *Listeria*. L'autre déposé dans 10ml de Tryptone sel, a servi au dénombrement et à la recherche des indicateurs. Tous les échantillons sont transportés au laboratoire dans une glacière à 4°C et immédiatement analysés.

#### **b) Recherche de *Listeria* par la méthode AFNOR V08 055**

Le protocole suivi est schématisé sur la figure 4. Les principales étapes sont:

- dénombrement par étalement de 0,1ml de milieu de base FRASER sur la gélose Palcam; incubation des isolements à 37°C pendant 48 heures,
- ajout du supplément sélectif FRASER AU 1/2 puis incubation des milieux à 30°C pendant 24 heures,
- isolement des enrichissements sur la gélose Palcam et transfert de 0,1ml dans 10ml de FRASER complet, incubation des subcultures ainsi que des boîtes de Palcam pendant 48 heures à 37°C,
- isolement des subcultures sur la gélose Palcam après 24 heures et 48 heures d'enrichissement, incubation à 37°C et lecture des isolements au bout de 48 heures.

#### **c) Recherche de *Listeria* par impédancemétrie**

Le protocole appliqué est résumé sur la figure 5. Les échantillons sont enrichis à 30°C dans 50ml de FRASER AU 1/2 dans le cas des écouvillons et 90ml dans le cas des éponges. Au bout de 18 heures, les cupules sontensemencées en double avec 0,1ml de bouillon auquel 0,9ml de milieu sélectif préparé est ajouté . Les modules sont incubés dans le Bactometer à 37°C. Après 30 heures de détection, les échantillons négatifs sont libérés, alors que les échantillons positifs sont répiqués sur la gélose Palcam pour être identifiés.

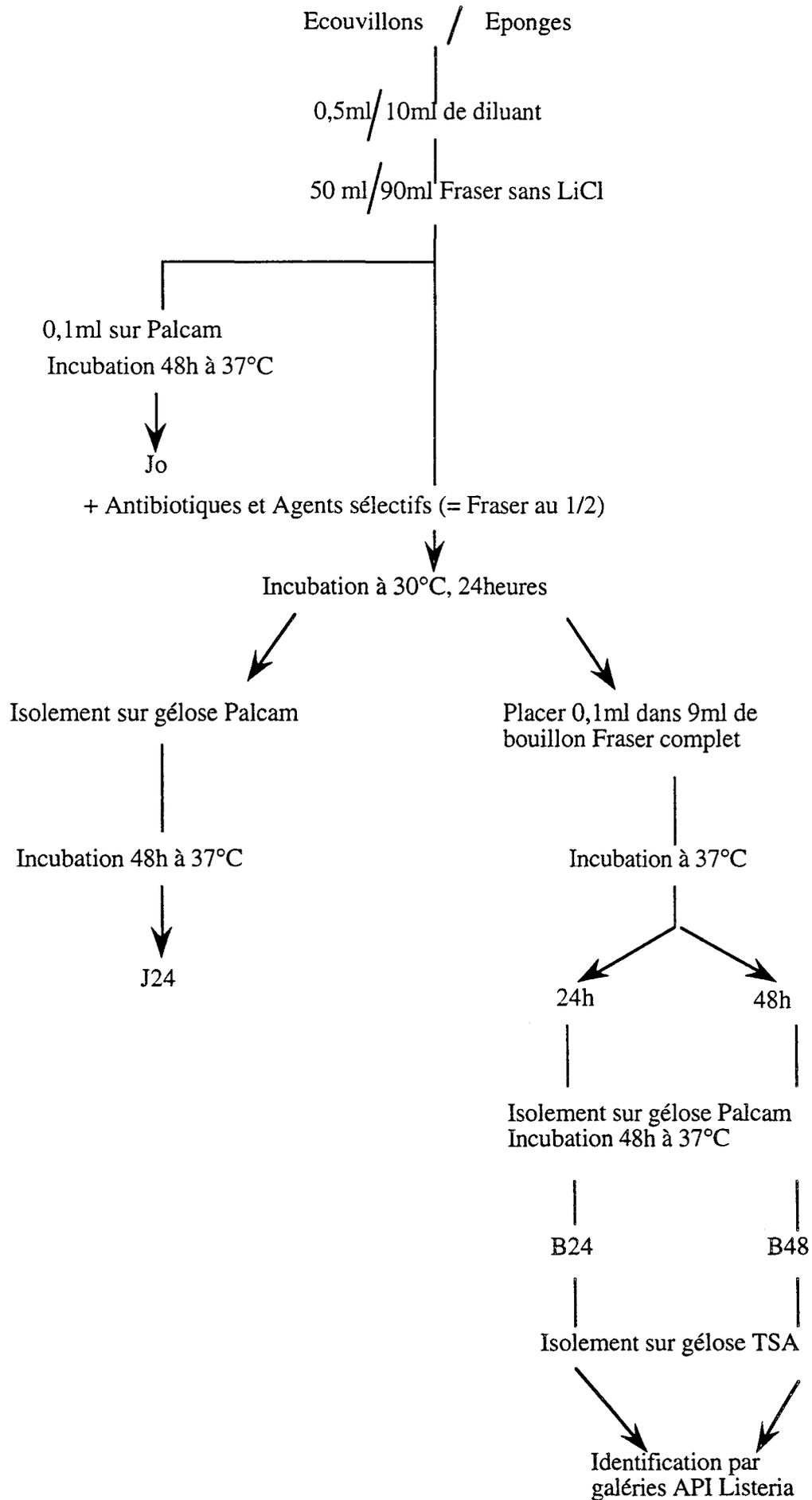


Figure 4: Protocole AFNOR V08 055 utilisé pour la recherche de Listeria

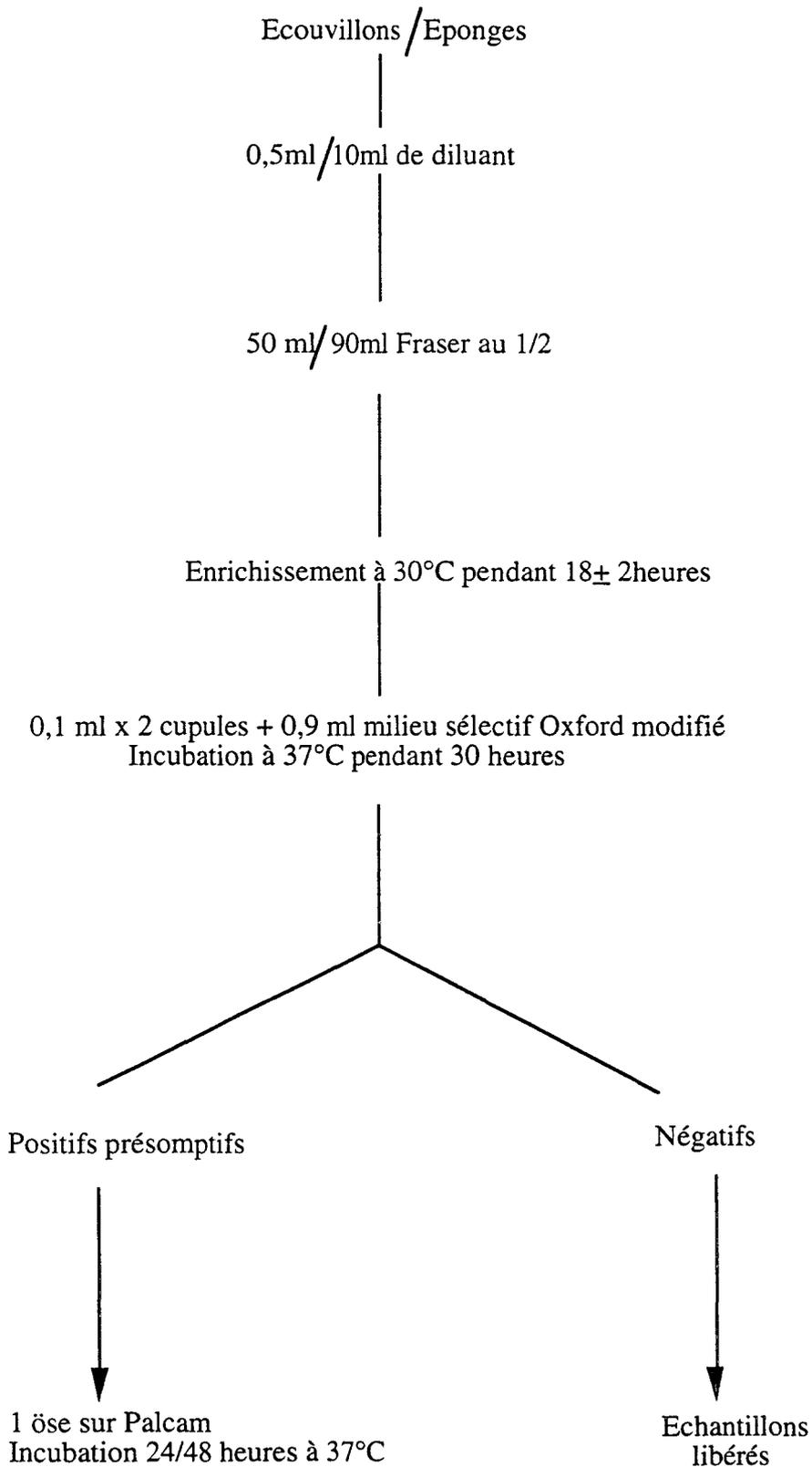


Figure 5: Protocole utilisé pour la recherche de *Listeria* par impédancemétrie

## II-2 4 LES METHODES D'IDENTIFICATION DE *LISTERIA*

### II-2 4 1 Les tests biochimiques

Les cultures de *Listeria* sur la gélose Palcam donnent en 48 heures des colonies de 1 à 2 mm de diamètre, marron vert foncé entourées d'un halo noir brun avec une dépression centrale et légèrement incrustées dans la gélose. Ce sont de petits bacilles Gram positif aux extrémités arrondies, isolés, en courtes chaînettes et surtout disposés en palissade. Ils possèdent la catalase et sont oxydase négative. De telles colonies sont repiquées (deux colonies par boîte) sur la gélose TSAYE (24 heures à 37°C) puis identifiées par les tests biochimiques sur des galeries miniaturisées Api<sup>®</sup> LISTERIA (bioMérieux, France) et par l'épreuve de Christie-Atkins-Munch-Peterson ou CAMP-test (Rocourt, 1989b) en présence de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*.

### II-2 4 2 Par la Chromatographie Phase Gazeuse (CPG)

#### a) Préparation des échantillons

Chaque échantillon est purifié sur 4 boîtes de gélose TSA et incubé à 28°C pendant 48 heures. Les colonies confluentes des 4 boîtes sur les quadrants 1 et 2 (les boîtes sont divisées en 4 quadrants) sont récupérées à l'aide d'une pipette pasteur et introduites dans un tube 13x100 mm (OSI). La quantité des cultures dans le tube doit être environ 4 mm pour espérer avoir de bonnes identifications (surface totale des pics supérieure à 50000). La préparation des échantillons pour la CPG se fait en quatre étapes:

**-Saponification:** Elle a pour objet la lyse des cellules bactériennes, libérant les acides gras membranaires sous forme de sel de sodium. Le réactif est composé d'hydroxyde de sodium 45 g, de méthanol et 150 ml d'eau distillée. 1ml est dispensé dans les tubes à l'aide d'une autopipette 0,4-2 ml (Hirschmann<sup>®</sup>, Germany) afin d'assurer la reproductibilité des distributions. La réaction se fait à 100°C pendant 30 min.

**-Méthylation:** Les acides gras libérés, peu volatils, sont transformés en esters méthyliques très volatils et faiblement solubles dans la phase aqueuse. La réaction se passe à 80°C pendant 10min avec 2ml de réactif contenant 325ml d'acide chlorhydrique 6N et 275 ml de méthanol. Le pH acide 1,5 assure la méthylation.

**-Extraction:** Les esters méthyliques sont extraits en phase organique en présence de 1,25ml de réactif constitué par 200ml d'hexane et de 200ml de méthyl tert-butyl ether (MTBE). L'extraction se passe à température ambiante sous agitation (Heidolph, Germany) pendant 10min.

**-Lavage:** Il permet d'éliminer toute trace d'eau et d'acide, néfaste à la colonne. La solution de lavage comprend 10,8g d'hydroxyde de sodium et 900ml d'eau distillée. Les 2/3 de la phase organique sont pipetés dans des cellules de mesure puis scellés pour l'analyse.

#### b) Les groupes

L'analyse des groupes a pour objectif de montrer la similarité entre des souches prises deux à deux. Le système MIS applique pour cela la méthode UPGMA (Unweighted Pair-Group Method) utilisant les moyennes arithmétiques. Nous avons exploité les deux programmes disponibles. Le Dendrogram est une analyse descriptive basée sur la classification hiérarchisée de la distance euclidienne (DE) calculée à l'aide du théorème de Pythagore entre des paires de souches. Il n'existe pas d'interprétation universelle de DE. Néanmoins selon les tendances, les observations suivantes s'imposent:

DE < 2	souches identiques
DE < 6	mêmes sous-espèces ou biotypes
DE < 10	mêmes espèces
DE < 25	appartenance au même genre

Le 2-D Plot permet de regrouper des échantillons semblables dans un espace à deux dimensions basé sur l'analyse de la variable principale qui est ici le profil des acides gras. Selon les tendances, l'interprétation est la suivante:

DE <sup>2</sup> = 15-30	souches identiques
DE <sup>2</sup> = 50-60	sous-espèces
DE <sup>2</sup> = 90-100	espèces proches

## II-2 5 LES TRAITEMENTS STATISTIQUES DES RESULTATS

La comparaison des résultats obtenus en impédancemétrie avec ceux de la méthode AFNOR V08 055 est effectuée par application du test  $\chi^2$  d'égalité de deux proportions (Schwartz, 1993). Les résultats d'analyse s'expriment en deux classes (positif ou négatif), on construit un tableau de contingence 2 x 2. On calcule d'abord un des effectifs théoriques par le total des lignes multiplié par le total des colonnes divisé par le total général. Les trois autres s'en déduisent par la différence à partir des totaux de lignes et de colonnes. On forme ensuite pour l'ensemble des quatre cases:

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - c)^2}{c}$$

On cherche le risque correspondant donné par la table des khi-deux pour le nombre de degré de liberté d.d.l. = (l-1)(c-1) c'est à dire 1.

-Si ce risque est inférieur à 3,84 pour  $\alpha = 5\%$ , la différence observée n'est pas significative.

-Si ce risque est supérieur à 3,84 pour  $\alpha = 5\%$ , les proportions observées sont significativement différentes et le degré de signification est fixé par le risque lu dans la table.

La spécificité et la sensibilité de la méthode impédancemétrie ont été calculées suivant les formules ci-dessous (Humbert et coll., 1990):

$$\text{Spécificité} = \frac{\text{Nombre de vrais négatifs}}{\text{Nombre de vrais négatifs} + \text{nombre de faux positifs}} \times 100$$

$$\text{Sensibilité} = \frac{\text{Nombre de vrais positifs}}{\text{Nombre de vrais positifs} + \text{nombre de faux négatifs}} \times 100$$

L'effet influent de l'oxyrase sur la rapidité du signal *Listeria* est mis en évidence par application du test de Student au risque  $\alpha = 5\%$  avec  $n_1+n_2-2$  ddl c'est à dire  $2n-2$  (ici  $n_1=n_2$ ).

Dans le cas des indicateurs, le test  $\chi^2$  (programme STAT-ITCF) a été utilisé pour évaluer la présence des indicateurs pris individuellement, en relation avec la détection de *Listeria*. La valeur du  $\chi^2$  calculé est confrontée à la valeur 11,070 lue pour d.d.l. = 5,  $\alpha = 5\%$  et le degré de signification du risque p est déterminé. En fonction de leur charge (cfu/cm<sup>2</sup>) dans les prélèvements, ces indicateurs sont groupés dans des intervalles choisis arbitrairement et comparés à la fréquence de détection de *Listeria*. La valeur du  $\chi^2$  calculé est confrontée à la valeur 3,84 lue pour un d.d.l. = 1,  $\alpha = 5\%$  et le degré de signification du risque p est également déterminé.

# RESULTATS

## III RESULTATS

### III-1 ETAPES DE SELECTION D'UN MILIEU APPROPRIÉ

#### III-1 1 LES MILIEUX COMPLETS

Cette étape de l'étude consiste à sélectionner une base convenable pour la technique de l'impédancemétrie en comparant six milieux traditionnels de recherche de *Listeria*. Les temps de détection (TD) repris dans le Tableau 7 montrent qu'aucun des milieux étudiés n'est approprié pour la recherche de *Listeria* par impédancemétrie. Sur les dix souches, au moins six espèces sont incapables de donner de signal sur l'un des milieux. Parmi ces espèces, *L. ivanovii* 5 ATCC 905398 et *L. seeligeri* NANTES 88/7136 sont de loin les plus sensibles aux inhibiteurs contenus dans les milieux. Pour le même milieu, la détection de certaines espèces est soit retardée soit annulée par inhibition des cellules bactériennes. D'autres par contre, sont normalement détectées. Les milieux OXB, Oxford et Palcam présentent des résultats sensiblement proches avec des effets plus atténués sur le dernier. Avec le milieu ASLM, on observe des TD plus longs et 6/10 des espèces testées sont inhibées. Si AC semble être le plus intéressant, *L. seeligeri* 88/7136 en culture dans ce milieu est incapable de donner de signal. Dans le cas de MVJ, *L. ivanovii* 5 905398 et *L. monocytogenes* 1/2c 86201 sont totalement inhibées.

Cependant les milieux AC et MVJ présentent des résultats acceptables en permettant la détection de la majorité des espèces dans des délais courts. Des valeurs nulles du pourcentage de variation de la capacitance observées sont plus importantes avec ASLM et Palcam qu'avec les autres milieux (Tableau 8). Les modifications du milieu AC sont électriquement faibles. Les variations de capacitance observées sont comprises entre 4 et 25% en général. Seul MVJ présente des valeurs élevées.

#### III-1 2 LES MILIEUX SANS LEUR SUPPLEMENT SELECTIF

Les résultats obtenus précédemment nous ont amené à tester les milieux liquides sans leur supplément sélectif. Nous avons remplacé le milieu ASLM qui possède la même formule de base que l'Oxford par le bouillon CC alors que l'OXB n'a plus été retenu. Les TD enregistrés sont en général courts avec des PVC élevés (Tableaux 9 et 10). Les milieux AC, CC et MVJ donnent des résultats identiques avec des TD inférieurs à 10 heures alors que sur les milieux Palcam et Oxford, les délais de réponse restent longs.

Espèces	AC	ASLM	MVJ	OXB	OXFORD	Palcam
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	+	-	-	-	-	-
<i>L. welshimeri</i> 987	++	+	++	++	++	++
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	-*	-	++	-	-	-
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	+++	+	++	++	+	++
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	+++	-	+	-*	-	-*
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	++	-	-	-	-*	-
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	++	++	++	++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	+	-	+++	-*	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	++	++	++	++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	++	-	+++	-*	-	++

Tableau 7: Détection de *Listeria* dans les milieux additionnés de leur supplément sélectif.

Légende: +++: TD < 10h; ++: 10h < TD < 24h; +: 24h < TD < 48h;

-\*: TD > 48h; -: isolements négatifs.

Espèces	AC	ASLM	MVJ	OXB	OXFORD	PALCAM
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	4,2	0	0	0	0	0
<i>L. welshimeri</i> 987	13,3	61,1	81,7	33,1	43,7	25,8
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	0	0	34,2	0	0	0
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	25,4	62,2	53,2	93,5	90,9	0
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	40,5	0	66,9	0	0	0
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	8,1	0	0	0	0	0
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	21,9	57,2	71,8	53,9	41,0	4,4
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	7,2	0	83,2	56,1	41,7	0
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	16	61,6	81,2	28,8	38,4	55,8
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	7,4	0	80,6	1,2	0	0

Tableau 8: Pourcentages de variation de capacitance des milieux contenant leur supplément sélectif en présence de *Listeria*.

Espèces	AC	CC	MVJ	OXFORD	PALCAM
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	+++	+++	+++	.*	.*
<i>L. welshimeri</i> 987	++	+++	+++	++	++
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	+++	+++	+++	+	+
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	+++	+++	+++	+	++
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	+++	+++	+++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	+++	+++	+++	.*	.*
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	+++	+++	+++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	+++	+++	+++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	+++	+++	+++	++	++
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	+++	+++	+++	++	++

Tableau 9: Détection de *Listeria* dans les milieux sans leur supplément sélectif.

Légende: +++: TD < 10h; ++: 10h < TD < 24h; +: 24h < TD < 48h;

.\*: TD > 48h; -: isoléments négatifs.

Espèces	AC	CC	MVJ	OXFORD	PALCAM
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	10,6	76,6	69,0	0	0
<i>L. welshimeri</i> 987	13,7	75,5	78,4	37,4	104,8
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	4,7	74,9	75,0	75,8	80,0
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	8,9	78,7	81,7	110,1	121,3
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	5,9	79,6	82,6	108,8	118,1
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	9,3	81,6	80,2	0	0
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	40,7	78,3	77,6	73,2	115
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	35,5	80,0	80,3	101,8	119,5
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	20,4	78,6	70,8	0	114,6
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	14,9	77,8	72,8	103,6	115,5

Tableau 10: Pourcentages de variation de capacitance des milieux sans leur supplément sélectif en présence de *Listeria*.

Ces milieux contiennent dans leur base 15mg/l de LiCl qui pourrait être à l'origine des inhibitions observées. Pour le milieu MVJ qui contient dans sa base 3 mg/l de LiCl, toutes les souches testées ont été détectées. Il apparaît ainsi un problème de concentration optimale de LiCl à définir pour les milieux impédancemétriques. *L. monocytogenes* 1/2a 35152 est totalement inhibée dans le milieu Oxford alors qu'elle est tardivement détectée dans le Palcam; ce qui est surprenant car ces deux milieux possèdent sensiblement la même formule de base. Les pourcentages de variation de capacitance observés sont en général importants sauf pour le milieu AC où ils restent encore faibles. On note aussi que les courbes obtenues sur AC sont irrégulières et moins discriminantes, alors que les milieux MVJ et CC présentent parfois des courbes atypiques à larges pics (Figures 6 et 7). Les bases des milieux Oxford et Palcam offrent des signaux distincts facilement interprétables avec une ligne de base stable.

Nous pouvons déduire de ces observations que la présence d'agents sélectifs ralentit la croissance de *Listeria* dans les milieux de culture et par conséquent prolongent les TD. Les milieux Oxford et Palcam seraient plus adaptés à la technique impédancemétrique pour la recherche de *Listeria* si l'on apportait des modifications dans leur formule de base. Nous allons donc étudié l'effet du LiCl sur la détection de *Listeria*.

### III-1 3 LES MILIEUX DE BASE SANS CHLORURE DE LITHIUM

Nos essais ont porté sur les milieux liquides Oxford, Palcam et MVJ. Les dix souches de *Listeria* testées sont détectées en moins de 9 heures (Tableau 11 et 12). Les PVC sont très élevés et représentent en moyenne  $125 \pm 7$ ,  $95 \pm 1$  et  $109 \pm 6$  respectivement pour les milieux Palcam, MVJ et Oxford. Ces résultats confirment bien que la présence de LiCl est néfaste pour la recherche de *Listeria* par impédancemétrie. Si nous utilisons les TD et les PVC comme critère de choix du milieu, nous retiendrons successivement les bases Palcam puis Oxford. La représentation graphique des signaux obtenus sur le milieu Oxford donne des courbes d'allure gaussienne avec un seul pic caractéristique de la présence de *Listeria*. Alors qu'avec le milieu Palcam les courbes présentent souvent un deuxième pic dans la phase de décroissance. Ces courbes insuffisamment spécifiques rendent ainsi difficile l'utilisation du Palcam pour la technique impédancemétrique (Figure 8 et 9). Dans le cas du MVJ, les pics restent largement ouverts quelque soit l'espèce testée.

En tenant compte des remarques précédentes, nous avons retenu l'Oxford (privés du chlorure de lithium) pour servir de base au milieu impédancemétrique.

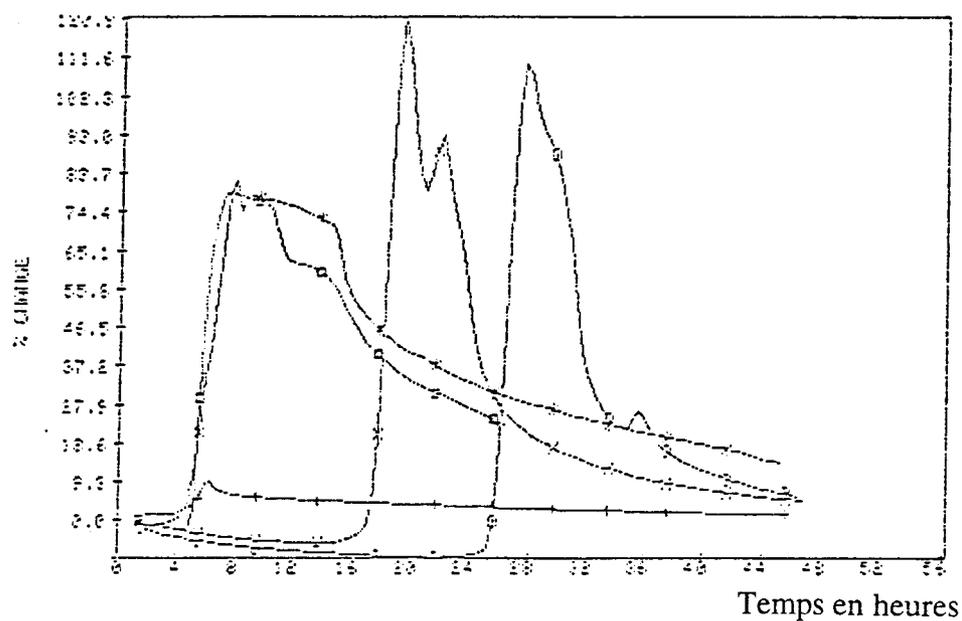


Figure 7: Courbes d'évolution de *L. monocytogenes* 4b 88/7137 dans différentes bases sans leur supplément sélectif (+: AC; x: MVJ; o: Oxford; \*: Palcam; ⊖: CC).

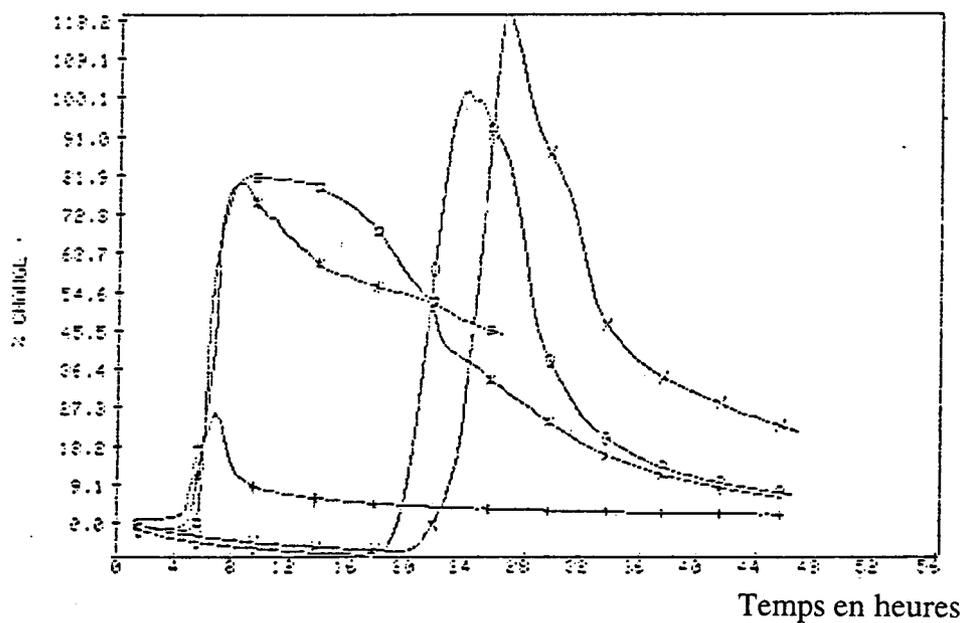


Figure 8: Courbes d'évolution de *L. innocua* 6b 87/7137 dans différentes bases sans leur supplément sélectif (+: AC; x: MVJ; o: Oxford; \*: Palcam; ⊖: CC).

Souches	Base Palcam	Base MVJ	Base OXFORD
	sans LiCl (TD en heures)	sans LiCl (TD en heures)	sans LiCl (TD en heures)
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	4,6	5,5	4,8
<i>L. welshimeri</i> 987	4,4	5,1	4,6
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	5,3	5,4	5,2
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	4,7	5,5	5
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	4,6	4,8	4,6
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	5,1	6	5,3
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	4,7	5	4,8
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	4,5	5	4,5
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	6,7	6,3	6,7
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	8,3	3,9	8,1

Tableau 11: Détection de *Listeria* dans les milieux liquides sans LiCl.

Souches	Base Palcam	Base MVJ	Base OXFORD
	sans LiCl (PVC)	sans LiCl (PVC)	sans LiCl (PVC)
<i>L.ivanovii</i> 5 905398	119	97	108,9
<i>L. welshimeri</i> 987	135,1	93,3	11,8
<i>L.seeligeri</i> 88/7136	130,2	94,8	108,5
<i>L.innocua</i> 6b 87/7137	127,5	93,6	110,8
<i>L.innocua</i> 6a 88/805/194	133	97,6	114,1
<i>L.monocytogenes</i> 1/2c 86201	121,8	92,3	108
<i>L.monocytogenes</i> 4b 19115	124,3	94	109,3
<i>L.monocytogenes</i> 4b 88/7137	127,4	97	117,7
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 35152	109,6	92,5	94,7
<i>L.monocytogenes</i> 1/2a 2725	124,4	94,9	109,3

Tableau 12: Pourcentages de variation de capacitance des milieux liquides sans LiCl en présence de *Listeria*.

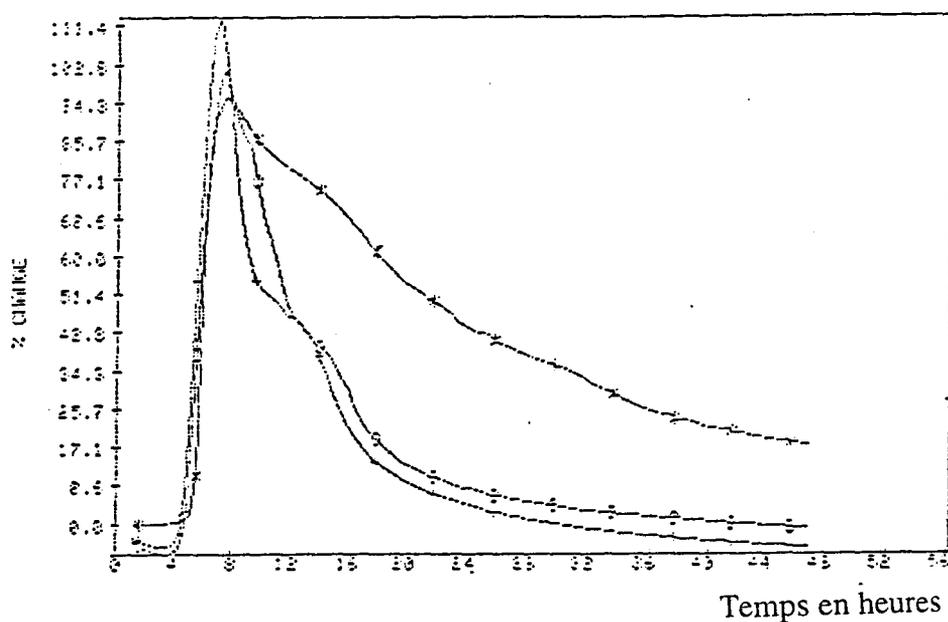


Figure 8: Courbes d'évolution de *L. monocytogenes* 4b 19115 dans différentes bases sans LiCl (\*: MVJ; o: Oxford; +: Palcam).

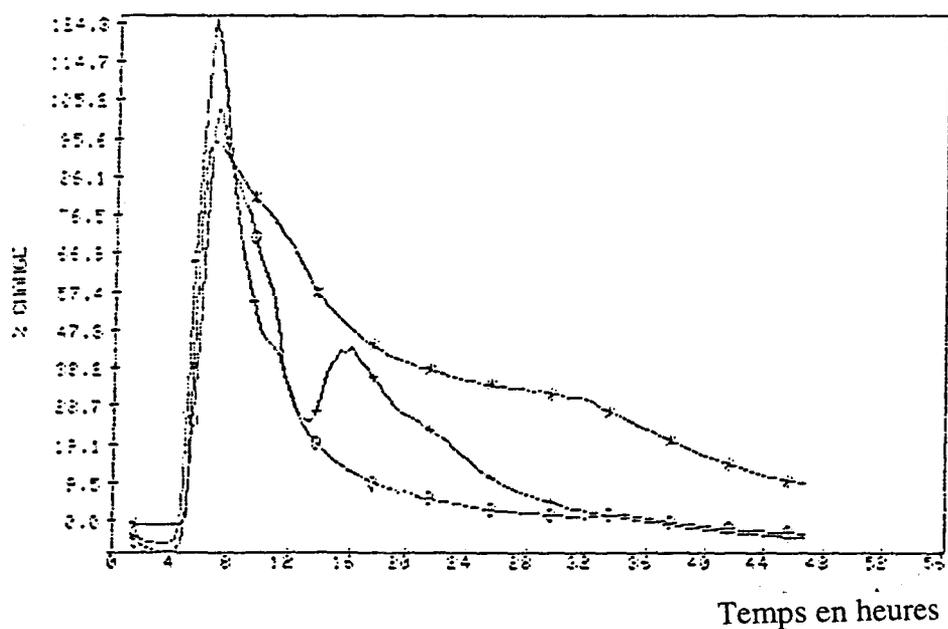


Figure 9: Courbes d'évolution de *L. welshimeri* 987 dans différentes bases sans LiCl (\*: MVJ; o: Oxford; +: Palcam).

### III-1 4 FORMULATION DU SUPPLEMENT SELECTIF

Ces expériences ont pour but d'obtenir une combinaison d'antibiotiques avec un spectre d'action le plus large possible afin d'inhiber la flore indésirable tout en préservant une bonne croissance de *Listeria*. Les résultats montrent que les facteurs principaux et leurs interactions sont influents sur la détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 (Tableau 13). Chacun des facteurs a un effet plus ou moins prononcé mais non néfaste. La Proflavine conduit à un doublement du temps de détection comparée aux résultats obtenus avec la Ceftazidime et la Nitrofurantoïne. Parmi les associations d'antibiotiques, l'essai 8 (Nitrofurantoïne 20mg/l + Proflavine 21mg/l + Ceftazidime 20mg/l) conduit à une inhibition complète de *Listeria*. L'esculine n'est pas métabolisée et les isolements sur la gélose PCA sont stériles. Avec l'essai 4 (Nitrofurantoïne 20mg/l + Proflavine 21mg/l), la multiplication de *Listeria* ainsi que son activité métabolique sont fortement ralenties; ce qui conduit à des temps de détection très longs.

Les essais 6 (Nitrofurantoïne 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l) et 7 (Proflavine 21mg/l + Ceftazidime 20mg/l) donnent les meilleurs résultats. Le temps de détection de *Listeria* avec l'essai 7 est d'environ deux fois celui de l'essai 6 avec cependant des variations du pourcentage de capacitance légèrement plus élevées. Les facteurs correspondants sont influents et l'examen des contrastes montre que les effets sont purs, désaliés des interactions 12, 13 et 23. Il ne sera donc pas nécessaire d'envisager un plan complémentaire.

Le modèle mathématique associé au plan factoriel  $2^{7-4}$  est le suivant en tenant compte des interactions:

$$y = 8 + 3x_1 + 4,70x_2 - 4,40x_3 + 2,10x_1 x_2 + 4,77x_1 x_3 - 4,60x_2 x_3$$

Le résultat moyen obtenu au milieu du domaine d'étude est de  $6 \pm 0,17$ . Ce résultat est comparable à l'effet moyen  $I_m = 8,07$  des facteurs principaux si l'on tient compte de l'erreur sur les réponses qui est de  $\pm 2$  heures. Le modèle mathématique proposé est donc valable.

Lorsqu'on applique ce plan d'expériences dans les mêmes conditions à *E. faecalis* comme flore indésirable, on remarque que la proflavine et la ceftazidime employées seules, tolèrent sa culture (Tableau 14). Le temps de détection en présence de la

N°des essais	Nitro	Prof	Ceft	LiCl	BM	Rham	$\alpha$ -Me-man	I	TD
	1	2	3	4=123	5=12	6=23	7=13		
1 <sup>a</sup> (8) <sup>b</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	3,2 $\pm$ 0,0
2(3)	+	-	-	+	-	+	-	+	4,8 $\pm$ 0,3
3(6)	-	+	-	+	-	-	+	+	8,0 $\pm$ 0,1
4(5)	+	+	-	-	+	-	-	+	38 $\pm$ 0,6
5(7)	-	-	+	+	+	-	-	+	3,5 $\pm$ 0,0
6(4)	+	-	+	-	-	-	+	+	5,5 $\pm$ 0,3
7(1)	-	+	+	-	-	+	-	+	9,0 $\pm$ 0,1
8(2)	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Niveau -	0mg/l	0mg/l	0mg/l	3mg/l	10mg/l	5mg/l	5mg/l
Niveau 0	10 mg/l	10,5 mg/l	10 mg/l	9 mg/l	15 mg/l	7,5 mg/l	7,5 mg/l
Niveau +	20mg/l	21mg/l	20mg/l	15mg/l	20mg/l	10mg/l	10mg/l

Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8
----------	---	---	---	---	---	---	---	---

Contrastes	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>M</sub>
	3	4,70	-4,40	-4,85	2,10	-4,60	4,77	8,93

Tableau 13: Matrice d'expériences et Matrice des effets appliquées à *L. monocytogenes* 4b 19115.

Légende: a = Numéro de l'essai

b = Ordre de passage de l'essai

N°des essais	Nitro	Prof	Ceft	LiCl	BM	Rham	α-Me-man	I	TD
	1	2	3	4=123	5=12	6=23	7=13		
1a(8) <sup>b</sup>	-	-	-	-	+	+	+	+	1,9
2(3)	+	-	-	+	-	+	-	+	0
3(6)	-	+	-	+	-	-	+	+	35,3
4(5)	+	+	-	-	+	-	-	+	0
5(7)	-	-	+	+	+	-	-	+	1,9
6(4)	+	-	+	-	-	-	+	+	0
7(1)	-	+	+	-	-	+	-	+	0
8(2)	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Niveau -	0mg/l	0mg/l	0mg/l	3mg/l	10mg/l	5mg/l	5mg/l
Niveau +	20mg/l	21mg/l	20mg/l	15mg/l	20mg/l	10mg/l	10mg/l

Diviseur	8	8	8	8	8	8	8	8
----------	---	---	---	---	---	---	---	---

Contrastes	I <sub>1</sub>	I <sub>2</sub>	I <sub>3</sub>	I <sub>4</sub>	I <sub>5</sub>	I <sub>6</sub>	I <sub>7</sub>	I <sub>M</sub>
	4,88	3,93	-4,41	4,41	4,41	-4,41	4,41	4,88

Tableau 14: Matrice d'expériences et Matrice des effets appliquées à *E. faecalis* 210867.

Légende: a= Numéro de l'essai

b= Ordre de passage de l'essai

ceftazidime est le même que celui du témoin sans antibiotiques. Dans les conditions d'essais utilisées, ce composé n'a aucun effet inhibiteur sur *E. faecalis*. Par contre la nitrofurantoïne et toutes les autres combinaisons notamment les essais 6 et 7 l'inhibent. Les temps de détection sont nuls et les isolements des cultures correspondantes sur la gélose PCA sont négatifs. Il se dégage de cette étude que ce sont les associations d'antibiotiques 6 et 7 qui donnent des résultats assez satisfaisants pour servir de suppléments sélectifs à notre milieu de base. Leur comparaison montre que le supplément constitué par la proflavine et la ceftazidime permet de détecter toutes les espèces de *Listeria* testées. La flore indésirable seule ou dans les mélanges complexes n'est pas détectée alors que le signal de *Listeria* est préservé (Tableau 15). Pour le supplément composé par la nitrofurantoïne et la ceftazidime, *L. ivanovii* 5 905398 n'est pas détectée. *B. cereus* et *C. aquaticum* présentent des temps de détection mais leur signal n'est pas typique de *Listeria* (Figure 10).

La courbe obtenue à partir du mélange témoin a été identifiée comme étant celle de *E. faecalis*. Elle est précoce (TD=1,3) et identique à celle de *Listeria* (Figure 11), alors que seule en culture pure, elle est inhibée par ce même supplément d'antibiotiques. Il existerait donc un effet mélange qui atténuerait le pouvoir bactéricide de ces antibiotiques en tolérant la multiplication des microorganismes résistants tel que *E. faecalis*. Pour la suite des essais, nous avons donc préféré le supplément 7 même si les temps de détection sont équivalents à deux fois ceux du supplément 6.

## III- 2 OPTIMISATION DES CONDITIONS DE DETECTION

### III-2 1 ROLE DU FER DANS LE MILIEU

Par cette étude, nous voulons remplacer le citrate de fer ammoniacal de notre milieu par une autre source de fer; le citrate étant un très bon substrat carboné pour *E. faecalis* qui est une bactérie compétitive de *Listeria*. Au niveau des temps de détection, on ne note pas de différence entre le témoin et les essais (Tableau 16). Elle est par contre remarquable au niveau de la qualité des courbes et de leur amplitude (Figure 12 et 13). Le milieu sans fer conduit à des courbes atypiques avec une amplitude très faible. Le citrate de fer ammoniacal et le sulfate ferrique d'ammonium produisent à peu près le même effet car les temps de détection, l'amplitude et le niveau de dérive du signal sont identiques mais la courbe nous semble mieux représentée en présence du citrate de fer. Il sera donc conservé dans la formulation de notre milieu de base.

Espèces	Proflavine 21mg/l + Ceftazidime 20mg/l	Nitrofurantoine 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l
<i>L. monocytogenes</i> 88/7137	13,35±0,07	14,70±0,28
<i>L. monocytogenes</i> 2879	10,55±0,21	10,95±0,63
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c 86201	9,15±0,07	7,55±0,21
<i>L. monocytogenes</i> 4b 19115	13,70±0,28	8,60±0,14
<i>L. innocua</i> 6a 88/805/94	8,30±0,00	8,70±0,56
<i>L. innocua</i> 87/5667	8,40±0,28	6,95±0,07
<i>L. ivanovii</i> 5 905398	29,20±0,00	0
<i>L. welshimeri</i> 987	10,55±0,21	9,70±0,14
<i>C. aquaticum</i>	0	2,70±0,00
<i>B. cereus</i>	0	6,70±0,03
<i>L. brevis</i>	0	0
Salmonelles spp.	0	0
<i>Y. enterocolitica</i> o:3	0	0
<i>E. coli</i> 10537	0	0
<i>Ps. fluorescens</i>	0	0
<i>P. mirabilis</i>	0	0
Témoin sans <i>Listeria</i>	0	1,25±0,05
Mélange 1	9,70±0,00	1,00±0,00

Tableau 15: Temps de détection des bactéries testées en présence de deux combinaisons d'antibiotiques dégagées par le plan d'expériences.

#### Légende

TD = 0 lorsqu'aucune détection n'est enregistrée à la fin de l'analyse.

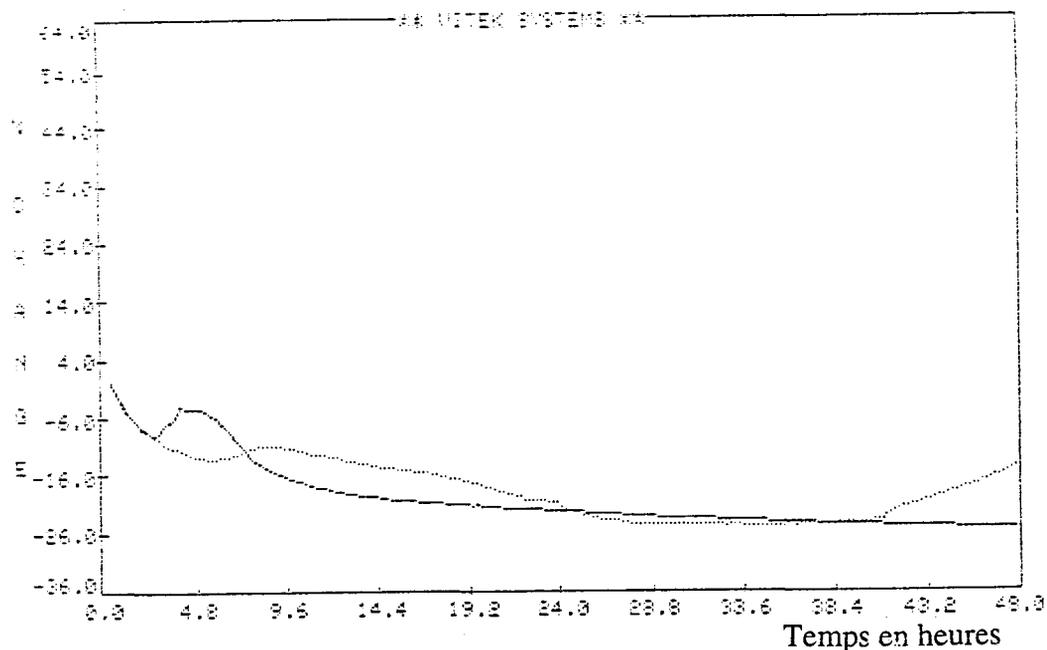


Figure 10: Signal des bactéries détectées dans le milieu Oxford sans LiCl additionné de Nitrofurantoïne 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l (\_\_\_\_\_: *C. aquaticum*; .....*B. cereus*).

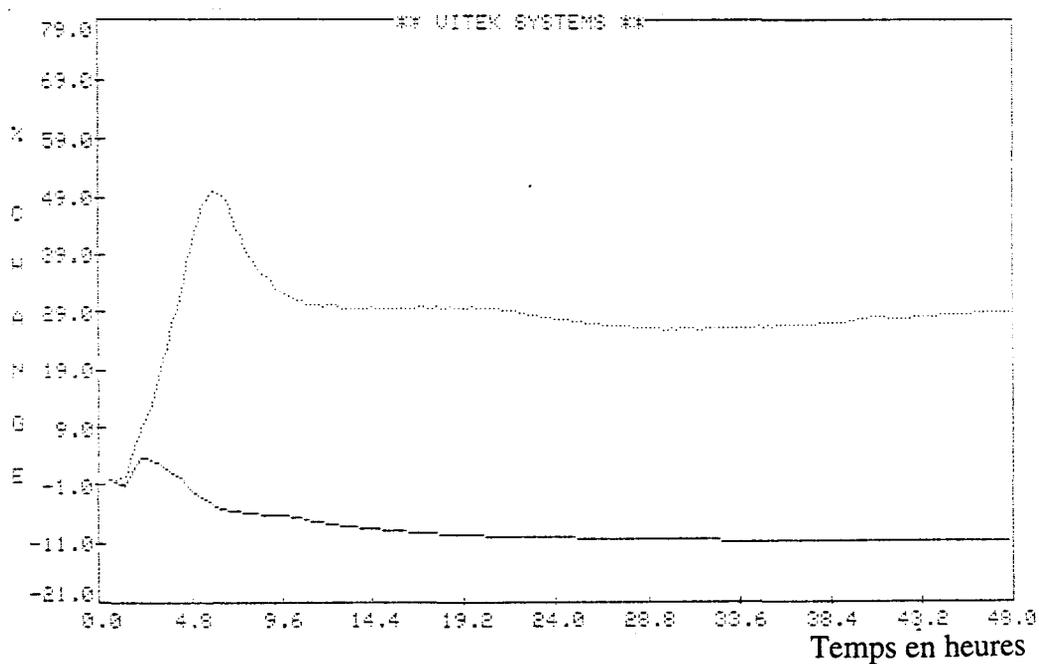


Figure 11: Signal de *E. faecalis* dans le mélange témoin sans *Listeria* en culture dans le milieu Oxford sans LiCl en présence d'antibiotiques (Proflavine 21mg/l + Ceftazidime 20mg/l: \_\_\_\_\_ et Nitrofurantoïne 20mg/l + Ceftazidime 20mg/l: .....).

---

TD en heures en fonction de la source de fer

Temoin	$C_6H_5O_7Fe(NH_4)_2$	$Fe(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4 \cdot 24H_2O$	$Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$
9,4±0,1	8,7±0,1	9,4±0,1	9±0,1

---

Tableau 16: Importance du fer dans le milieu impédancemétrique sur la détection de *L. monocytogenes* 4b 19115.

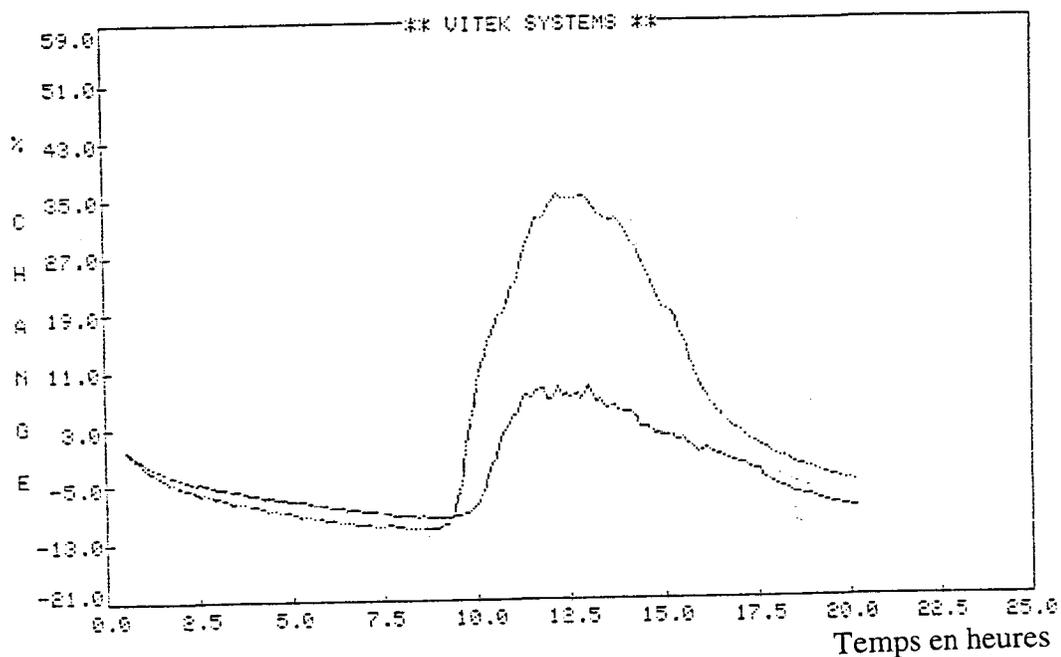


Figure 12: Détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en impédancemétrie dans le milieu Temoin sans fer (\_\_\_\_\_) et dans l'essai avec du fer (\_\_\_\_):  $C_6H_5O_7Fe(NH_4)_2$ .

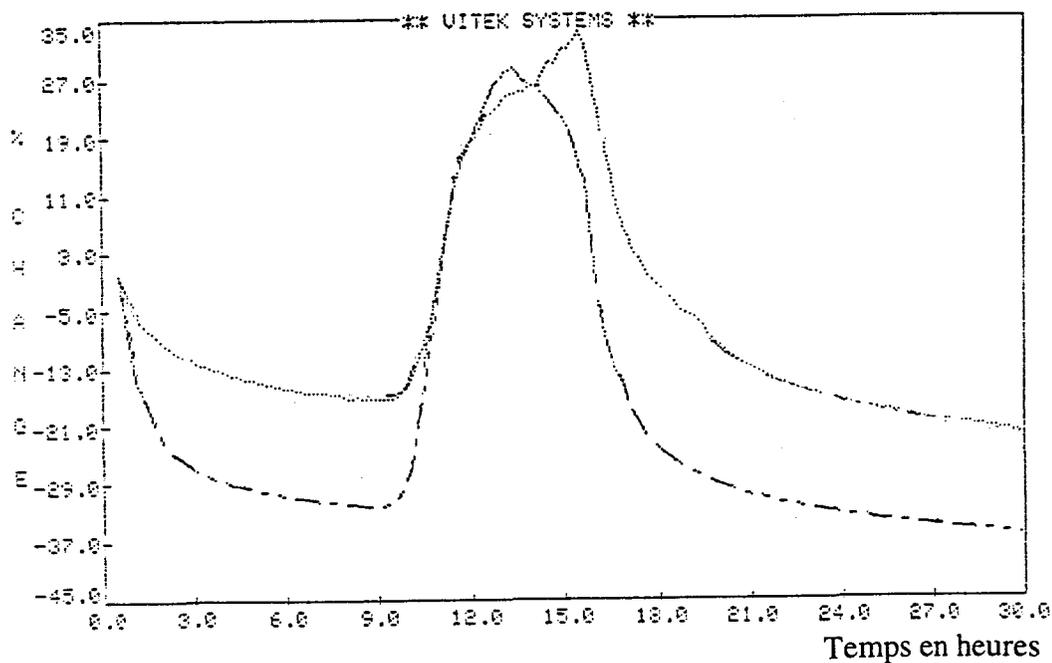


Figure 13: Détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en impédancemétrie dans le milieu contenant du fer: (.....)  $Fe(SO_4)_3(NH_4)_2SO_4 \cdot 24H_2O$  et (\_\_\_\_)  $Fe(SO_4) \cdot 7H_2O$ .

La courbe avec le sulfate ferrique d'ammonium semble inhabituelle. Celles obtenues en présence du sulfate ferreux sont typiques mais la dérive au niveau de la ligne de base est élevée. En conséquence le pourcentage de variation de capacitance dans les valeurs positives de l'échelle est plus faible comparé à celui des deux autres composés. La détermination des paramètres mesurés est moins précise et sous estimée dans ces conditions. Les trois substances étudiées peuvent cependant servir de source de fer, indispensable pour une bonne détection de *Listeria*. Au-delà de ces résultats, il apparaît que l'ion ammonium contribue à une variation appréciable de la capacitance du milieu car son absence dans la formule du sulfate de fer conduit à une dérive importante de la ligne de base.

### III-2 2 DETERMINATION DU pH OPTIMAL DU MILIEU

Nous constatons que l'amplitude des courbes est nettement plus importante en mesurant la capacitance par rapport à la conductance (Tableau 17). Si en conductance les variations en pourcentage semblent augmenter avec le pH, en capacitance elles sont difficilement prévisibles. Néanmoins entre les pH 6,8 et 7,40, les courbes de capacitance sont plus typiques à *Listeria*, discriminantes et donc faciles à interpréter. Dans ces conditions, on prévoit que la présence de composés à pH basiques contribueront à une augmentation de la capacitance du milieu. Mais à pH 7,64 et pour des valeurs supérieures, le signal devient non reproductible et irrégulier avec plusieurs petits pics. A pH 5,45 et en deçà, il s'annule et les courbes restent parfaitement plates. Pour la conductance, toutes les courbes sont à peu près identiques, de faible amplitude, avec des pics larges et arrondis (Figure 14, 15). Comme ci-dessus, les courbes sont stables entre les pH 6,8 et 7,40. Mais une forte déflexion survient à 7,64 et pour des valeurs supérieures puis les courbes s'annulent à pH 8,20. A pH 5 et en deçà, aucune détection n'est possible. L'esculine n'est plus métabolisée et les cultures de *Listeria* sont négatives après isolement sur la gélose PCA.

Ces résultats confirment bien l'importance du pH du milieu sur la mesure de la capacitance et de la conductance. Par contre, il n'y a pas de différence significative au niveau des temps de détection lorsqu'on mesure aussi bien la conductance que la capacitance. Les courbes d'évolution des temps de détection en fonction du pH du milieu sont semblables et synchroniques (Figure 16). A partir de pH 7, les TD semblent croître linéairement avec l'augmentation du pH initial du milieu. Entre pH 6-7, ils sont invariables et au delà du pH 6, les modifications des TD sont aléatoires. Ces résultats sont parfaitement répétables (Figure 17).

pH	<u>Conductance</u>		<u>Capacitance</u>	
	TD (heures)	PVC (%)	TD (heures)	PVC (%)
8,18	30,5	0	26,9	153
7,79	24,60±1,60	21	25	78
7,64	25,65±2,75	20	20,85±1,35	166,5±4,5
7,46	19,50±0,40	24,45±2,5	19,60 ± 0,4	74
7,40	16,35±0,15	19±1	17,2	65
7,30	15	18	14,7	54
7,24	13,05±0,55	17	11,25±0,25	63±1
7,14	9,65±0,15	15	9,55±0,15	52
7,09	8,95±0,25	15	9,2	49
6,95	7,45±0,15	16	7,25±0,05	52±3
6,78	6,50±0,10	15	6,15±0,15	47
6,37	6,40±0,10	11	6,15±0,05	119
6,22	6,30±0,10	10	6	46
5,99	6,8	10	6,5	44±2
5,80	7,85±0,05	10	10,25±0,15	25±1
5,45	10,4±0,20	7	0	0
5,30	17,95±0,45	7	0	0
5	0	0	0	0
4,79	0	0	0	0

Tableau 17: Variation de la capacitance et de la conductance en fonction du pH initial du milieu sélectif Oxford sans LiCl.

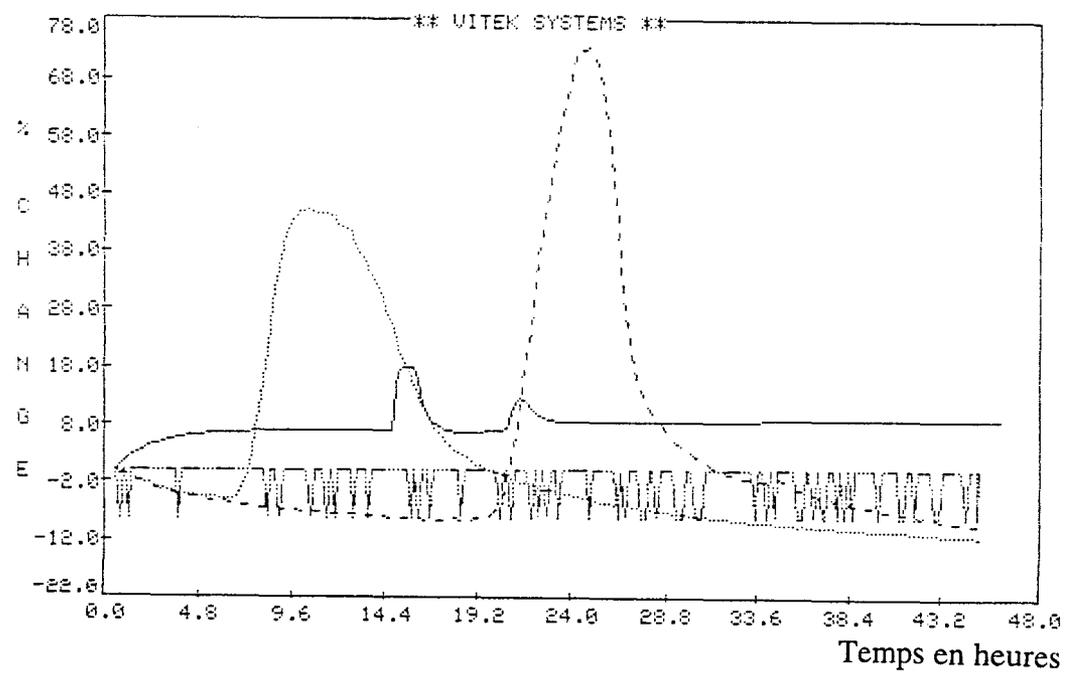


Figure 14: Les courbes de capacitance de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction de différents pH du milieu. \_\_\_\_\_: pH 8,2;.....: pH 7,46; ... .. : pH 6; \_.....\_: pH 5.

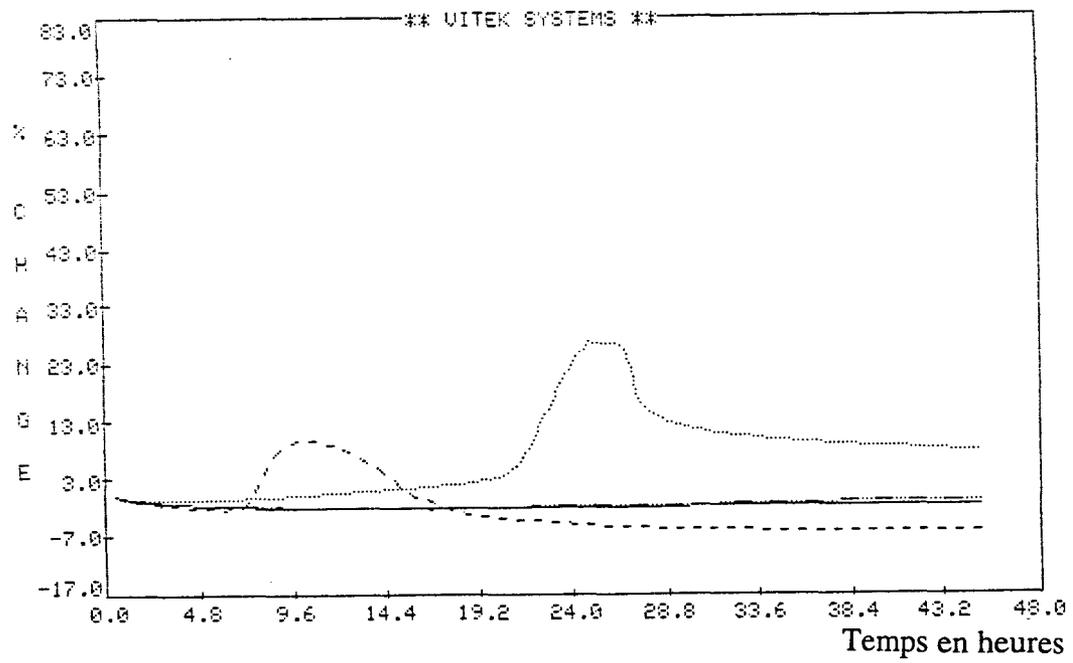


Figure 15: Les courbes de conductance de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction de différents pH du milieu. \_\_\_\_\_: pH 8,2;.....: pH 7,46; ... .. : pH 6; \_.....\_: pH 5.

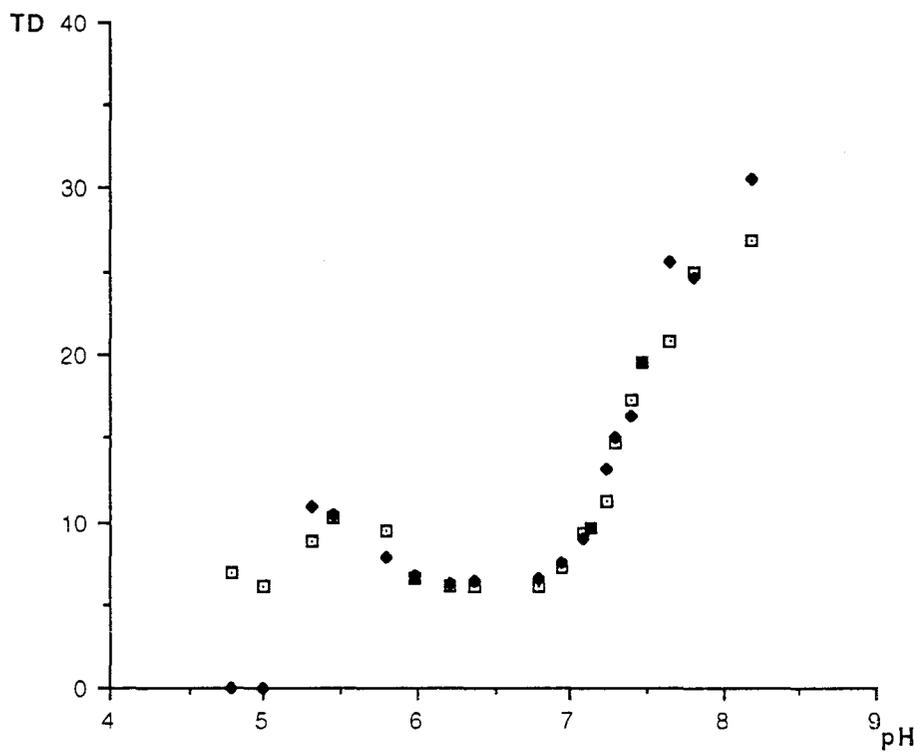


Figure 16: Variation des temps de détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction du pH initial du milieu.

- TD capacitance
- ◆ TD Conductance

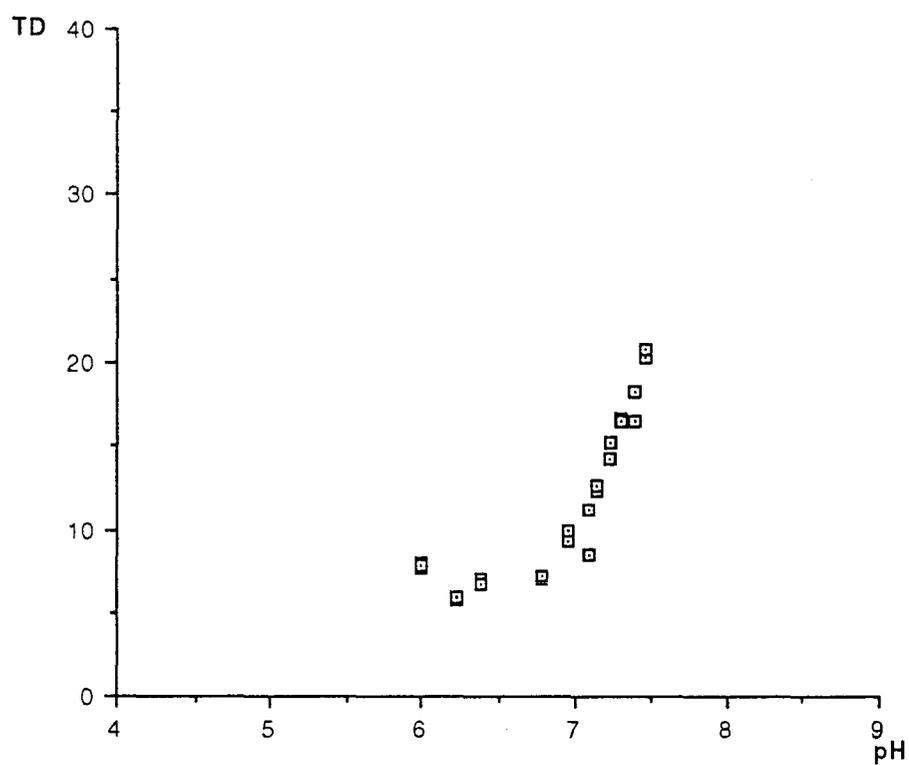


Figure 17: Répétabilité du temps de détection de *L. monocytogenes* 4b 19115 en fonction du pH initial du milieu.

En capacitance, les TD sont nuls pour des valeurs de pH inférieures ou égales à 5,45 alors qu'en conductance ils le sont seulement à partir de pH 5. Mais les valeurs de pH optimal, qui permettent d'obtenir des temps de détection courts avec des pourcentages de variation de capacitance élevés, se situent entre pH 6,5 et 7.

### III-2 3 ORIGINE DES VARIATIONS DE CAPACITANCE

Par cette étude, nous voulons connaître les différents composés ionisés qui sont formés au cours du temps dans le milieu lors de la détection de *Listeria* afin d'optimiser le signal. Pour cela, nous avons considéré les différentes étapes d'une courbe de *Listeria* en cinq phases:

Phase 1 = Période de latence

Phase 2 = Période entre la fin du temps de latence et début de la phase exponentielle

Phase 3 = Phase exponentielle de croissance du signal

Phase 4 = Début de la décroissance du signal

Phase 5 = Fin du signal

Les bilans en acides organiques sont répertoriés sur les graphiques correspondants (Figure 18, 19). Ce sont les données du refractomètre. Nous n'avons pas tenu compte des données quantitatives car il s'agit d'un milieu complexe pour lequel il est difficile de suivre la formation des produits car leur origine est diversifiée. Les composés identifiés semblent correspondre aux produits du métabolisme oxydatif et fermentaire. Le maltose, l'acide lactique, l'acide acétique et le glycérol sont communs à toutes les étapes identifiées. L'acide butyrique apparaît dans les quatre phases initiales et non dans la phase finale du signal. L'acide propionique apparaît de façon irrégulière. Parmi les composés intermédiaires du cycle de Krebs, seulement l'acide citrique et l'acide succinique sont rencontrés. Un seul acide iso est présent. Des corps non identifiés figurent également sur le chromatogramme.

### III-2 4 CARACTERISTIQUES DU SIGNAL *LISTERIA* EN CONDUCTANCE DIRECTE ET INDIRECTE

Le but de cette manipulation était de comparer les réponses en conductance de notre milieu (adapté à la mesure de la capacitance) à celles obtenues avec le milieu AES destiné lui, à la mesure de la conductance. Nous avons également tenté de suivre le signal de *Listeria* par la technique de l'impédancemétrie indirecte afin d'évaluer sa reproductibilité et sa qualité par rapport au signal obtenu en conductancemétrie directe.

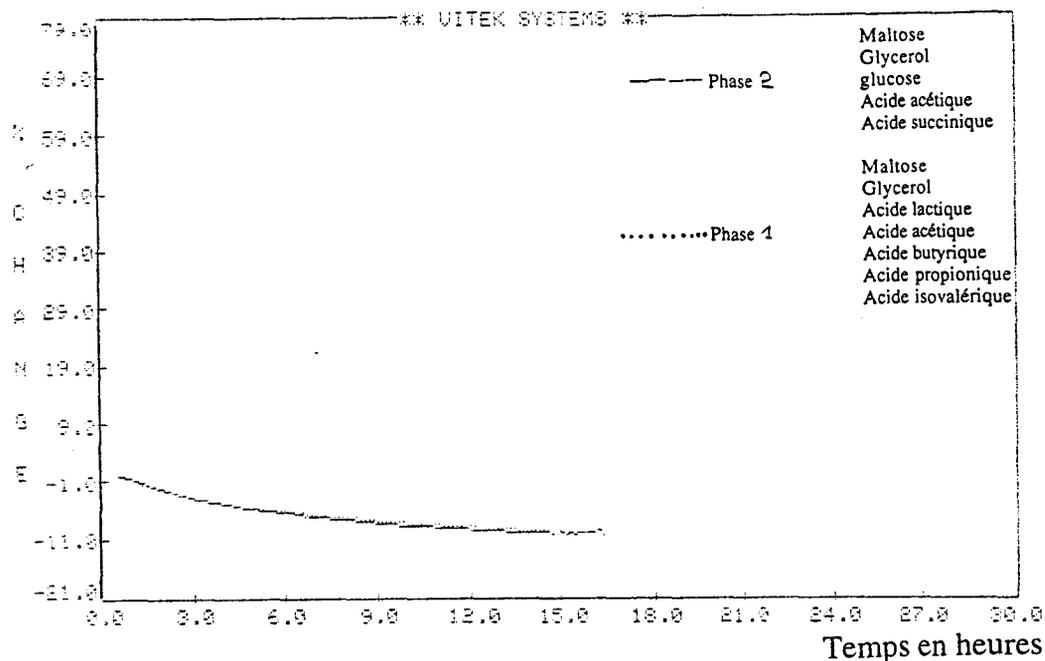


Figure 18: Types de composés organiques formés au cours des différentes étapes de détection de *Listeria* en impédancemétrie (.....: phase 1; \_\_\_\_\_: phase 2).

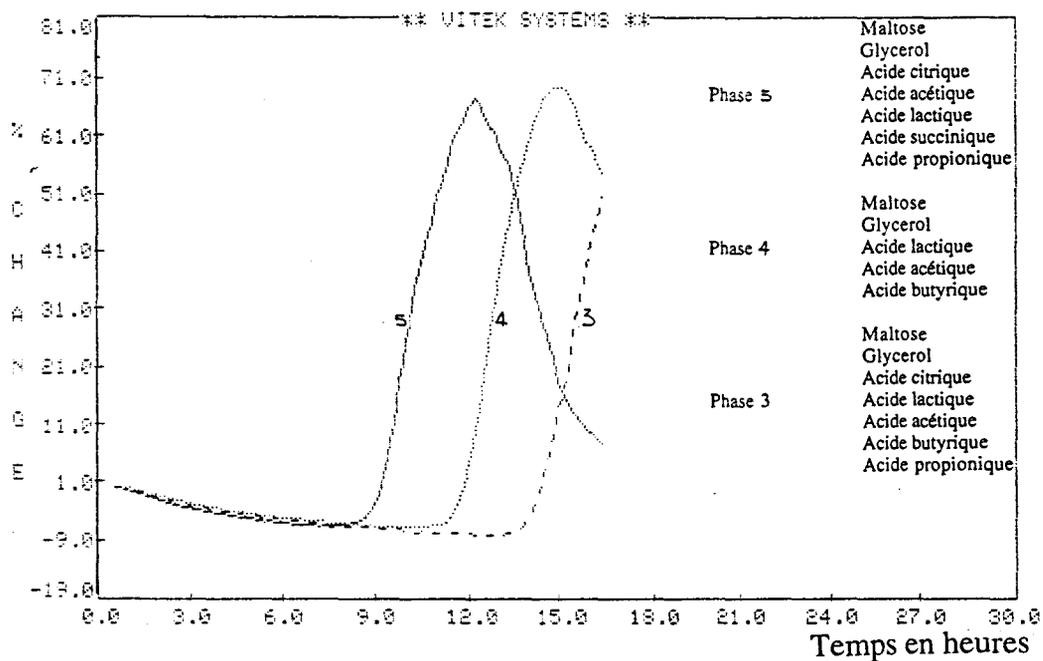


Figure 19: Types de composés organiques formés au cours des différentes étapes de détection de *Listeria* en impédancemétrie (... ..: phase 3; .....: phase 4; \_\_\_\_\_: phase 5).

### III-2 4 1 Milieu Pasteur

La conductance initiale du milieu témoin est d'environ 21475  $\mu\text{S}$  (Figure 20). Certaines courbes enregistrées ne présentent ni phase de latence ni plateau matérialisant la fin de production de métabolites chargés. La phase d'accélération est continue jusqu'à la fin du délai d'analyse (Figure 21). D'autres par contre restent plates sans modification sensible de la conductance initiale du milieu. Ainsi les courbes du milieu témoin sont identiques à celles des essais. Tous les résultats sont non reproductibles et difficilement interprétables. Des perturbations sont souvent observées dues à l'eau de condensation qui se forme sur la paroi des cellules de mesure et retombe dans le milieu de culture. La formation de cette eau de condensation est la conséquence de la différence de température existante entre la température ambiante de la salle et celle des modules d'incubation. Ainsi la majorité des courbes obtenues montrent une déflexion du signal (Figure 20).

### III-2 4 2 Milieu AES

La conductance initiale du milieu témoin est d'environ 13925  $\mu\text{S}$ . Les modifications de la conductance du milieu sont détectables. Les temps de détection pour les quatre essais se situent pratiquement à 6 heures. Les courbes obtenues sont assez caractéristiques d'une courbe de conductance microbienne. Mais elles sont peu reproductibles (Figure 22).

Indépendamment des problèmes de reproduction, le TD de *Listeria* sur ce milieu est sensiblement identique au TD obtenu en capacitance avec le milieu Pasteur.

### III-2 5 DETECTION DE *LISTERIA* EN PRESENCE D'OXYRASE

Sur les treize espèces, onze sont détectées avec le milieu contenant l'oxyrase alors que ce nombre est de 10 pour le milieu sans oxyrase. Les temps de détection observés pour les deux types de milieu sont statistiquement différents au seuil  $p < 0,005$ . La présence de l'oxyrase réduit les délais de détection. Elle n'interfère ni sur le signal au niveau du pourcentage de variation de la capacitance ni sur l'aspect des courbes de *Listeria*. *L. ivanovii* 5 19119 et *L. grayi* n'ont pas donné de réponse au bout des 48 heures d'analyse. Elles sont sensibles aux antibiotiques utilisés dans le milieu car l'esculine n'est pas métabolisée et les isollements sur le PCA sont restés négatifs (Tableau 18).

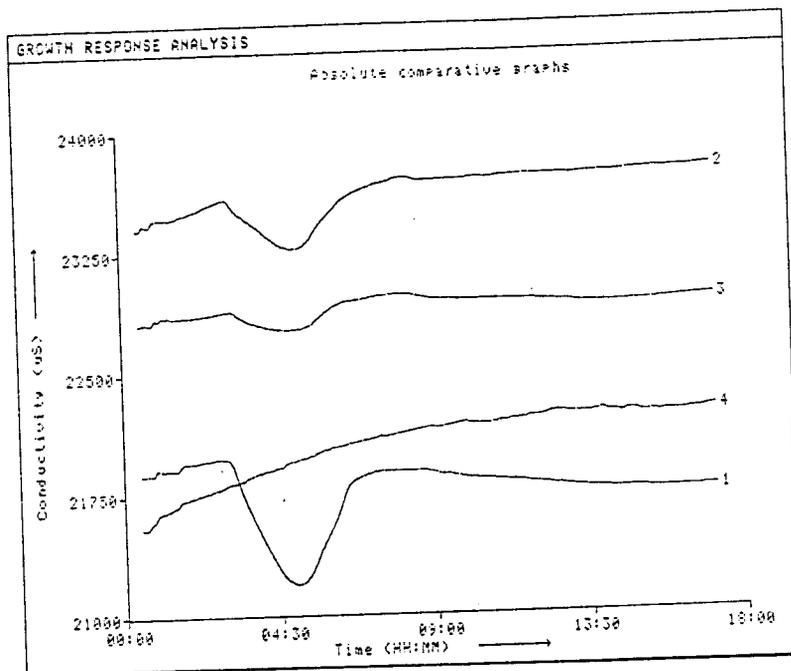


Figure 20: Evolution des courbes de conductance directe de *Listeria* en culture dans le milieu Pasteur. 1, 2, 3: Essais et 4: Témoin milieu.

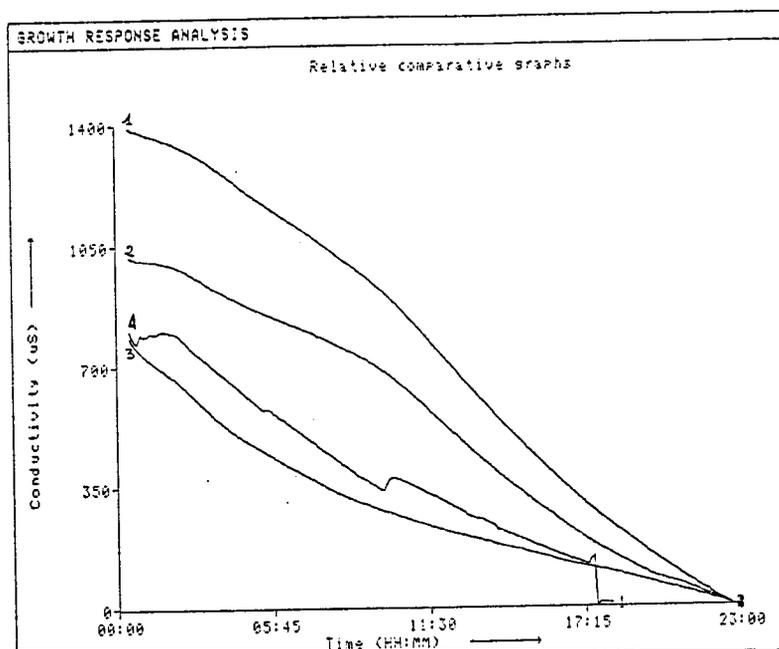


Figure 21: Evolution des courbes de conductance indirecte de *Listeria* en culture dans le milieu Pasteur. 1, 2, 3: Essais et 4: Témoin milieu.

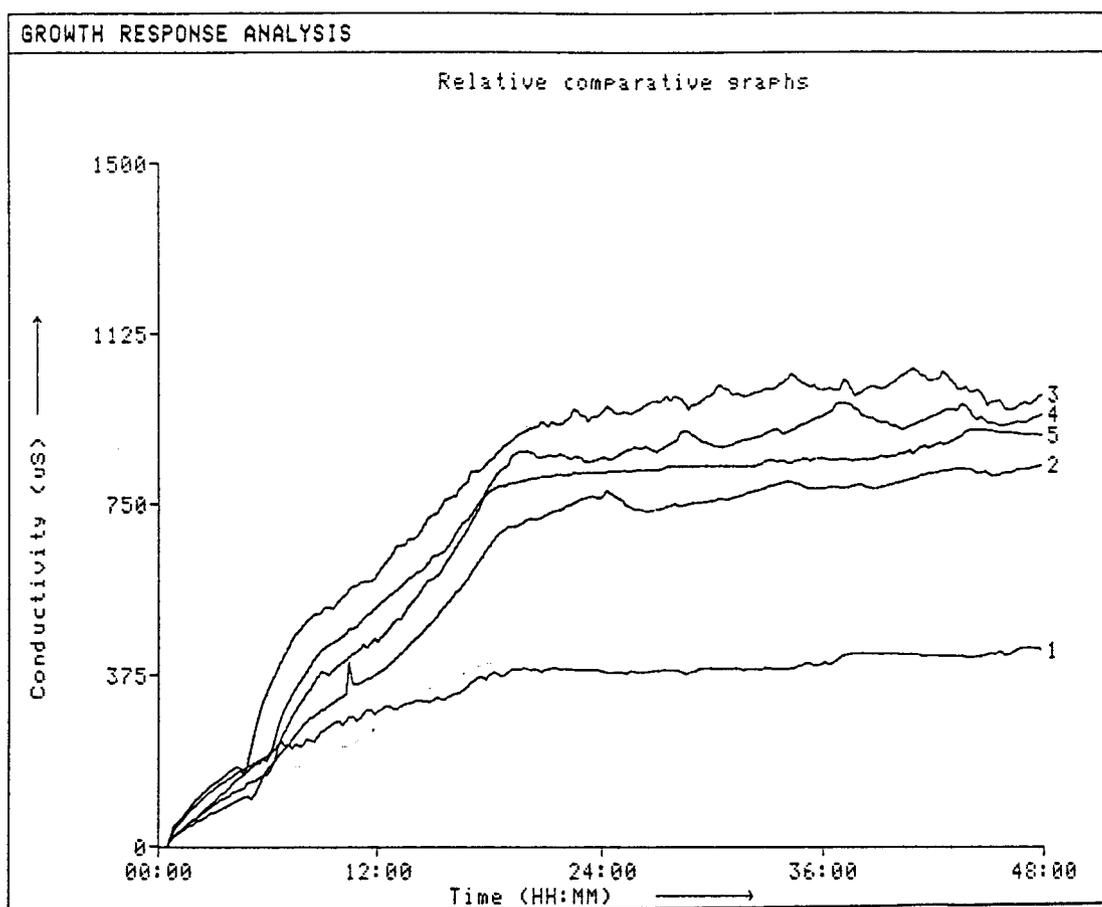


Figure 22: Evolution des courbes de conductance directe de *Listeria* en culture dans le milieu AES. 1: Témoin milieu et 2, 3, 4, 5: Essais.

Espèces analysées	Milieu* sans oxyrase TD (en heures)	Milieu* avec oxyrase TD (en heures)
<i>L. ivanovii</i> 5 19119	00	00
<i>L. welshimeri</i> 35897	7,35±0,05	4,25±0,05
<i>L. welshimeri</i> 6a 93/16/017	6,10±0,10	4,7±0,60
<i>L. innocua</i> 6a 93/18/044	6,35±0,15	4,25±0,15
<i>L. innocua</i> SND 94/213510	7,25±0,05	5,25±0,05
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c 94/170884	7,05±0,35	4,25±0,05
<i>L. monocytogenes</i> 4b 94/209695	6,5±0,10	3,75±0,05
<i>L. monocytogenes</i> 4b 2375	12	7,15±0,15
<i>L. monocytogenes</i> 4a19114	00	38,55±0,65
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b 94/171286	6	4,20±0,10
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a 93/15/269	10,1±0,10	6,35±0,05
<i>L. monocytogenes</i> SND 94/213510	10,65±0,15	5,70±0,12
<i>L. grayi</i> 19120	00	00

Tableau 18: Temps de détection en heures de *Listeria* en présence et en absence d'oxyrase par impédancemétrie.

Légende: \*= Milieu Oxford sans LiCl contenant la Proflavine 21mg/l et la Ceftazidime 20mg/l.

### III-2 6 TEMPS DE GENERATION (TG) DE *L. MONOCYTOGENES* 4b 19115 DANS LES MILIEUX LEB, UVM I ET FRASER AU 1/2

La détermination du tg de *L. monocytogenes* à partir des bouillons sélectifs FRASER AU 1/2, UVM I et LEB employés dans les méthodes classiques doit nous permettre d'une part de mieux sélectionner le milieu d'enrichissement et d'autre part de calculer certaines variables permettant de prévoir le temps minimum d'incubation des prélèvements à analyser.

Les droites de régression de logN en TD selon la loi des moindres carrés donnent de très bons coefficients de corrélation qui sont respectivement de -0,918, -0,884 et -0,939 pour les milieux FRASER AU 1/2, UVM I et LEB (Figure 23, 24, 25). La relation mathématique de proportionnalité entre la concentration bactérienne initiale et le TD est ainsi démontrée en accord avec la littérature. Ceci permet d'exploiter confortablement les résultats. A partir des équations de droite obtenues, nous avons donc calculé les tg de *L. monocytogenes* 4b 19115 dans chacun de ces milieux de la façon suivante:

#### milieu FRASER AU 1/2

$$\text{tg} = \log 2/B = 0,3/0,35 = 0,83 \text{ heure soit } 50,0 \text{ min}$$

#### milieu UVM I

$$\text{tg} = \log 2/B = 0,3/0,51 = 0,58 \text{ heure soit } 34,8 \text{ min}$$

#### milieu LEB

$$\text{tg} = \log 2/B = 0,3/0,55 = 0,55 \text{ heure soit } 33,0 \text{ min}$$

Le tg dans le milieu FRASER AU 1/2 est plus élevé que celui obtenu avec les milieux UVM I et LEB. Ces deux derniers présentent sensiblement le même résultat. Les taux de croissance calculés à partir des trois milieux sont respectivement de 0,36, 0,52 et 0,55. Les bouillons UVM I et LEB qui ne contiennent pas de chlorure de lithium dans leur formule montrent des taux de croissance de *L. monocytogenes* 4b 19115 équivalents et plus importants que celui du FRASER AU 1/2. Ce dernier possède la même formulation que l'UVM I à la différence qu'il contient en plus, 3g/l de chlorure de lithium dans sa base. Cette substance semble donc avoir un effet sur l'allongement du tg et sur le faible taux de croissance observé avec le bouillon FRASER AU 1/2.

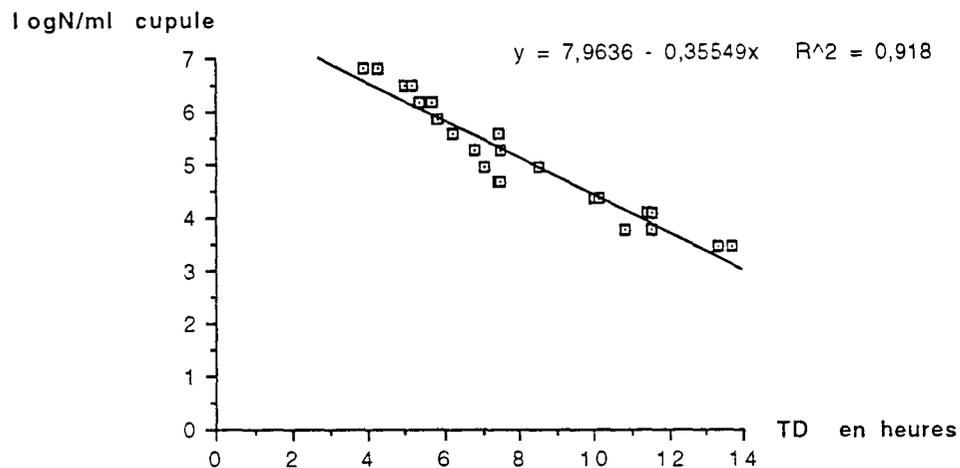


Figure 23: Droite de regression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu Fraser au 1/2.

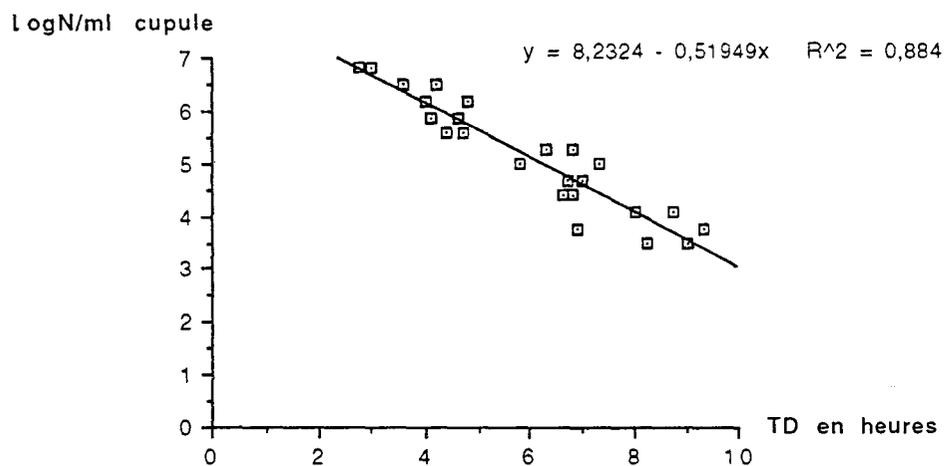


Figure 24: Droite de regression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu UVMI.

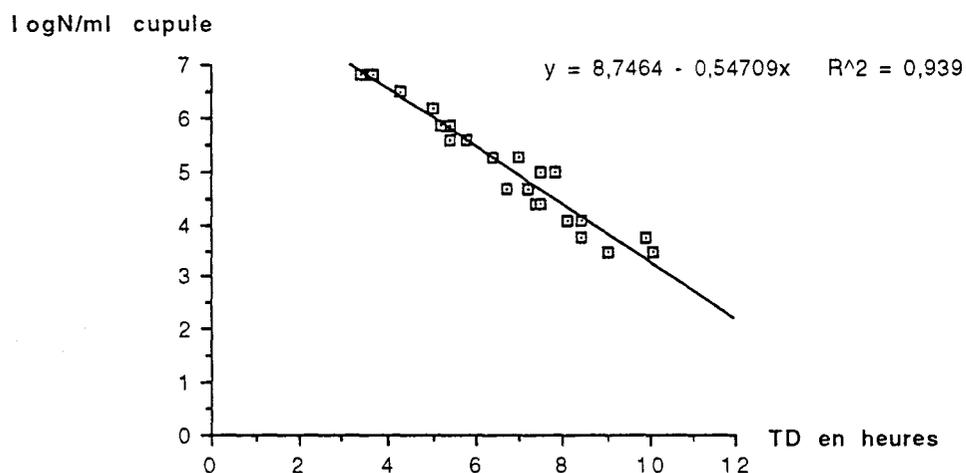


Figure 25: Droite de regression de la concentration bactérienne en fonction du temps de détection dans le milieu LEB.

### III-2 7 SEUIL DE DETECTION DE *LISTERIA* ET PREVISION DES DURÉES D'ENRICHISSEMENT DES ECHANTILLONS

Les temps de latence moyens pour les milieux FRASER AU 1/2, UVMI et LEB sont respectivement de 35 min, 45 min et 35 min. A partir des équations de droite (Figure 23, 24, 25) le calcul des seuils de détection se fait de la façon suivante:

#### milieu FRASER AU 1/2

$$A' = A - B' T_L = 7,96 - 0,35 \times (35/60) = 7,75 \text{ soit } 5,60 \cdot 10^7 \text{ cellules/ml}$$

#### milieu UVMI

$$A' = A - B' T_L = 8,23 - 0,51 \times (45/60) = 7,84 \text{ soit } 6,90 \cdot 10^7 \text{ cellules/ml}$$

#### milieu LEB

$$A' = A - B' T_L = 8,74 - 0,55 \times (35/60) = 8,40 \text{ soit } 2,50 \cdot 10^8 \text{ cellules/ml}$$

Les seuils de détection de *Listeria* sont sensiblement identiques pour les milieux FRASER AU 1/2 et UVMI et peu différents de celui du bouillon LEB. Pour notre étude, ils sont compris entre  $10^7$ - $10^8$  cellules/ml.

La détermination des seuils de détection nous a permis d'estimer le temps minimum d'incubation  $t$  des échantillons nécessaire pour atteindre ce seuil. Si nous estimons  $N$  comme étant la concentration bactérienne à l'instant TD, pour un échantillon contenant au départ 1 *Listeria*/ml ( $N_0$ ) le temps d'incubation  $t$  sera:

$$N(TD) = N_0 2^n = N_0 2^{t/tg} \text{ soit } t = \log N \times tg / \log 2$$

$N_0$  = concentration initiale de *Listeria* à l'instant  $t_0$

$N$  = concentration initiale de *Listeria* à l'instant TD (temps de détection)

$tg$  = temps de génération de *Listeria*

$t$  = temps d'incubation à déterminer

$n$  = nombre de cycles de doublements de la population initiale de *Listeria*

milieu FRASER AU 1/2

$$t = 7,75 \times 0,85/0,3 = 22,00 \text{ heures}$$

milieu UVM1

$$t = 7,84 \times 0,58/0,3 = 15,20 \text{ heures}$$

milieu LEB

$$t = 8,40 \times 0,55/0,3 = 15,40 \text{ heures}$$

Les résultats obtenus avec les milieux UVM1 et LEB sont comparables. Dans les mêmes conditions d'essai, il faut environ 6 heures d'incubation de plus pour le milieu FRASER AU 1/2. Le temps moyen d'incubation est de  $18 \pm 3$  heures pour les trois milieux confondus. C'est ce temps que nous avons retenu ainsi que le milieu FRASER AU 1/2 pour l'enrichissement sélectif des échantillons collectés à partir des environnements industriels.

### III-3 VALIDATION DE LA METHODE MISE AU POINT

#### III-3 1 SPECIFICITE ET SELECTIVITE DU MILIEU

Trois espèces dont *L. monocytogenes* 4b 19114, *L. grayi* 19120 et *L. ivanovii* 5 19119 ne sont pas détectées (Tableau 19, 20). Les TD et les PVC sont nuls. Mais elles sont viables et cultivables car les isollements du contenu des cupules correspondantes, sur la gélose PCA sont positifs. Leur métabolisme est par contre perturbé; la coloration initiale du milieu n'a pas changé. *L. ivanovii* 5 905398 est détectée tardivement mais le PVC est si faible que la courbe enregistrée est difficilement interprétable. La détection de *L. seeligeri* varie en fonction de la souche. Le TD de *L. seeligeri* 88/7136 est long. Sa multiplication est ralentie sans être inhibée par les antibiotiques du milieu. En conséquence, la courbe obtenue au bout de 48 heures d'incubation coïncide avec le début de la phase de décrochement et ne présente pas toutes les caractéristiques d'un signal typique. *L. seeligeri* 1/2b 35967 est détectée seulement au bout de 20 heures de culture mais le PVC est important. Toutes les autres espèces présentent des TD courts en général inférieurs à 10 heures sauf *L. innocua* 6b 33091 qui est détectée au bout de 14 heures.

Espèces	TD (heures)	PVC (%)	Courbes typiques
<i>L.monocytogenes</i> 1/2 164851	10±0,10	55±5	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2 166170	17,1±0,40	50,5±2,50	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2 167711	12,3±0,30	57,5±4,50	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c 86/201	9,15±0,05	62±2	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c 94/170884	7,05±0,35	87	+
<i>L. monocytogenes</i> 4b 88/7137	13,35±0,05	56	+
<i>L. monocytogenes</i> 4b 19115	10,40	74	+
<i>L. monocytogenes</i> 4b 2375	10,7±0,60	74±3	+
<i>L. monocytogenes</i> 4b 94/209695	6,5±0,10	94,5±4,50	+
<i>L.monocytogenes</i> 4 166171(2)	5,80	67,5±3,50	+
<i>L.monocytogenes</i> 4 167759	11,8±0,30	67,5±2,50	+
<i>L. monocytogenes</i> 4a 19114	0	0	-
<i>L. monocytogenes</i> 4c 19118	17,5±0,4	74	+
<i>L. monocytogenes</i> 4d 19117	13,8±0,20	48±2	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b 166171 (2)	5,80	75,5±1,50	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b 94/171286	6	92	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b 2755	15,1±0,30	68±12	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a 93/15/269	10,1±0,1	80	+
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a 2725	10,55±0,15	56	+
<i>L.monocytogenes</i> 7 2482	24,35±0,15	74	+
<i>L. monocytogenes</i> 3b 2540	15,15±0,05	74	+
<i>L. monocytogenes</i> 3c 2479	19±0,30	74	+
<i>L. monocytogenes</i> SND 300260	10,9±0,30	96	+
<i>L. monocytogenes</i> SND 166204	8,5±0,10	74±12	+
<i>L. monocytogenes</i> SND 167757	12,25±0,05	84	+
<i>L. monocytogenes</i> SND 94/213510	10,65±0,15	50,5±5,50	+

Tableau 19: Détection des souches de *L. monocytogenes* par impédancemétrie en culture pure dans le milieu sélectif formulé.

Espèces	TD (heures)	PVC (%)	Courbes typiques
<i>L. ivanovii</i> 5 905398	29,2	10	-
<i>L. ivanovii</i> 5 19119	00	00	-
<i>L. welshimeri</i> SND 987	10,35±0,21	40±20	+
<i>L. welshimeri</i> 6b35897	7,35±0,05	80	+
<i>L. welshimeri</i> 6b 935331	11,3±0,10	51,5±1,50	+
<i>L. welshimeri</i> SND 935335	8,90	70	+
<i>L. welshimeri</i> 6a 93/16/017	6,1±0,10	108±4	+
<i>L. seeligeri</i> SND 88/7136	41,60	00	-
<i>L. seeligeri</i> 1/2b 35967	19,6±0,20	75	+
<i>L. innocua</i> 6b 33091	14,3±0,30	74	+
<i>L. innocua</i> 6b 935327	9,9±0,10	51±1	+
<i>L. innocua</i> 6b 935545	7,75±0,15	70	+
<i>L. innocua</i> 6a 935328	7,60	104	+
<i>L. innocua</i> 6a 935329	8,4±0,10	85,5±1,5	+
<i>L. innocua</i> 6a 935330	6,1±0,10	100	+
<i>L. innocua</i> 6a 935333	7,7±0,10	70±10	+
<i>L. innocua</i> 6a 935334	7,3±0,20	87,25±3,25	+
<i>L. innocua</i> 6a 935338	8±0,10	80	+
<i>L. innocua</i> 6a 935339	8,4±0,60	91	+
<i>L. innocua</i> 6a 935545	7,75±0,15	75	+
<i>L. innocua</i> 6a 935546	8,35±0,05	84±6	+
<i>L. innocua</i> 6a 935547	6,7±0,10	106±6	+
<i>L. innocua</i> 6a 88/805/194	8,3	53±2	+
<i>L. innocua</i> 6a 93/18/044	6,35±0,15	108±4	+
<i>L. innocua</i> SND 94/213510	7,25±0,05	77	+
<i>L. grayi</i> 19120	00	00	-

Tableau 20: Détection des autres espèces de *Listeria* par impédancemétrie en culture pure dans le milieu sélectif formulé.

Les modifications du milieu sont considérables car les PVC s'échelonnent entre 50 et 100. Ces paramètres électriques varient énormément d'une espèce à l'autre et au sein d'une même espèce, d'un sérovar à l'autre. Les courbes sont semblables et caractéristiques de *Listeria*. Toutes les souches détectées métabolisent l'esculine car la coloration initiale des cupules vire au noir. Leur viabilité n'est pas affectée par la présence dans le milieu d'agents sélectifs.

Mais les bactéries non désirées sont inhibées tandis que *Listeria* est détectée à partir des mélanges polymicrobiens sans que les TD ne soient considérablement modifiés (Tableau 21). L'isolement du contenu des cupules correspondantes à ces mélanges montre très souvent des colonies uniformes et typiques de *Listeria*, preuve que le milieu formulé est très sélectif. L'allure des courbes n'est pas également affectée. De petits pics précoces non significatifs sont obtenus en début de signal pour chacun des mélanges en réponse à la présence d'une forte charge et variée de la flore annexe. L'amplitude de ces pics est équivalente à celle du témoin. Mais les conditions du milieu étant défavorables à cette flore, leur multiplication et leur activité métabolique sont reprimées. Au bout de 10 heures d'action des antibiotiques, ce sont les modifications dues à *Listeria* qui sont détectées (Figure 26, 27).

### III-3 2 RECHERCHE DE *LISTERIA* DANS L'ENVIRONNEMENT

#### III-3 2 1 PAR LA METHODE AFNOR V08 055

Sur les 248 prélèvements, 50 contenaient des *Listeria* par les deux méthodes cumulées (AFNOR V08 055 et impédancemétrie) (4 échantillons étaient contaminés simultanément par deux espèces différentes) soit 20% de positifs. La méthode de référence a permis de mettre en évidence 48 positifs. Parmi les espèces identifiées on note dans l'ordre des fréquences: *L. monocytogenes* 50%, *L. innocua* 37%, *L. seeligeri* 7% et *L. welshimeri* 6% (Tableau 22). *L. monocytogenes* est présente dans des proportions très variées d'un environnement à l'autre alors que *L. innocua* peut être considérée comme une flore commune et banale. Si *L. seeligeri* est rarement isolée, elle semble prépondérante dans les usines E et F qui travaillent sur le même type de matière première. La plupart de ces échantillons sont faiblement contaminés avec des niveaux de moins de 2ufc/cm<sup>2</sup> de surface. Un seul présente des taux de *Listeria* d'environ 50 ufc/cm<sup>2</sup> de surface. Les échantillons obtenus dans l'usine A sont contaminés à 46% dont 22% proviennent des prélèvements du sol où nous avons d'ailleurs isolé des *L. monocytogenes*. Cette espèce est également présente dans la salle des matières premières, sur le matériel de travail et dans un bac de récupération de produit fini (Tableau 23).

Espèces	TD (heures)	PVC (%)	Control*
<i>Acinetobacter</i>	0	0	Négatif
<i>Bacillus cereus</i> 528	0	0	Négatif
<i>Bacillus cereus</i> 38/01/81	0	0	Négatif
<i>Bacillus coagulans</i>	0	0	Négatif
<i>Bacillus mycoïdes</i>	0	0	Négatif
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	0	0	Négatif
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	Négatif
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10537	0	0	Négatif
<i>Escherichia coli</i>	0	0	Négatif
<i>Enterococcus durans</i> 504	0	0	Négatif
<i>Enterococcus faecalis</i> 210867	0	0	Négatif
<i>Enterococcus faecium</i> 502	0	0	Négatif
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	Négatif
<i>Erysipelothrix</i>	0	0	Négatif
<i>Lactobacillus brevis</i>	0	0	Négatif
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0	0	Négatif
<i>Morganella morganii</i>	0	0	Négatif
<i>Pediococcus acidilactici</i>	0	0	Négatif
<i>Proteus mirabilis</i> 216-28/01/85	0	0	Négatif
<i>Proteus vulgaris</i>	0	0	Négatif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	0	Négatif
<i>Salmonella</i> spp. 135003	0	0	Négatif
<i>Salmonella typhi</i>	0	0	Négatif
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	0	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i> IPP 53154	0	0	Négatif
<i>Staphylococcus aureus</i> IPP 53154	0	0	Négatif
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0	Négatif
<i>Yersinia enterocolitica</i> o:3	0	0	Négatif
<i>Yersinia enterocolitica</i> CR 14	0	0	Négatif
<i>Yersinia intermedia</i>	0	0	Négatif
Temoin sans <i>Listeria</i>	0	7	Négatif
Melange 1	9,7	35±2	Positif
Melange 2	8±0,42	36±5	Positif
Melange 3	10,10	38±3	Positif
Melange 4	9,05±261	25±4	Positif

Tableau 21: Détection de la flore de contamination en absence ou en présence de *Listeria* dans le milieu sélectif formulé.

Légende: \* = Les confirmations sont faites sur les géloses Palcam (cas des mélanges) et TSA (OGA ou MRS) en fonction de la souche pour les cultures pures.

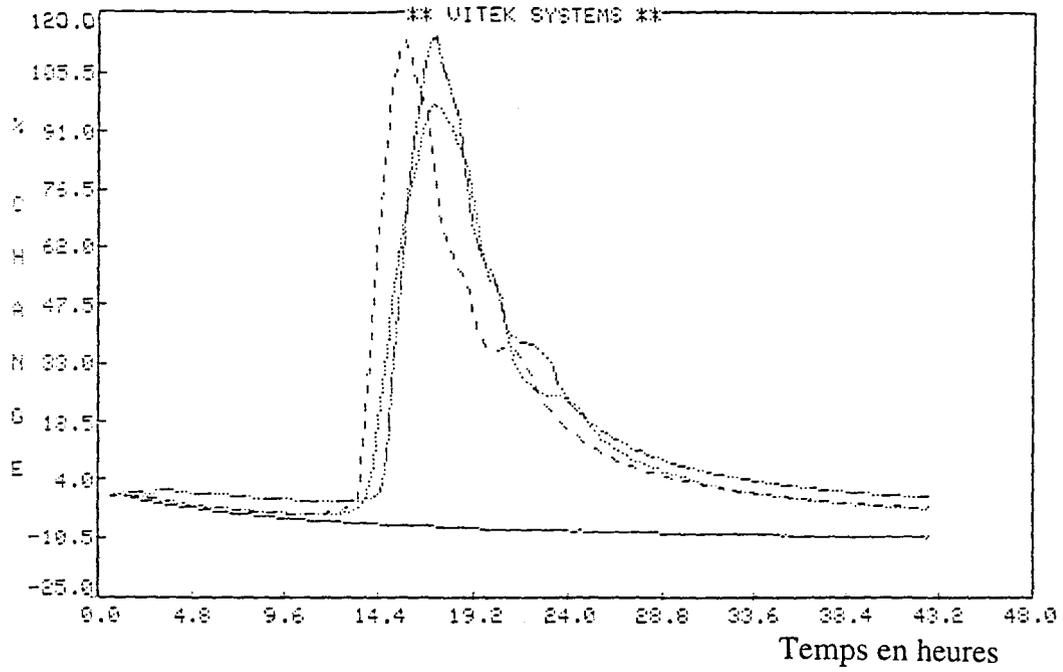


Figure 26: Signal typique de *Listeria* en impédancemétrie

(\_\_\_\_\_ : Témoin milieu; ..... : *L. monocytogenes* 4b 94/209695;  
 ..... : *L. innocua* 6a 93/18/044; .. . . . : *L. welshimeri* 6a 93/16/017).

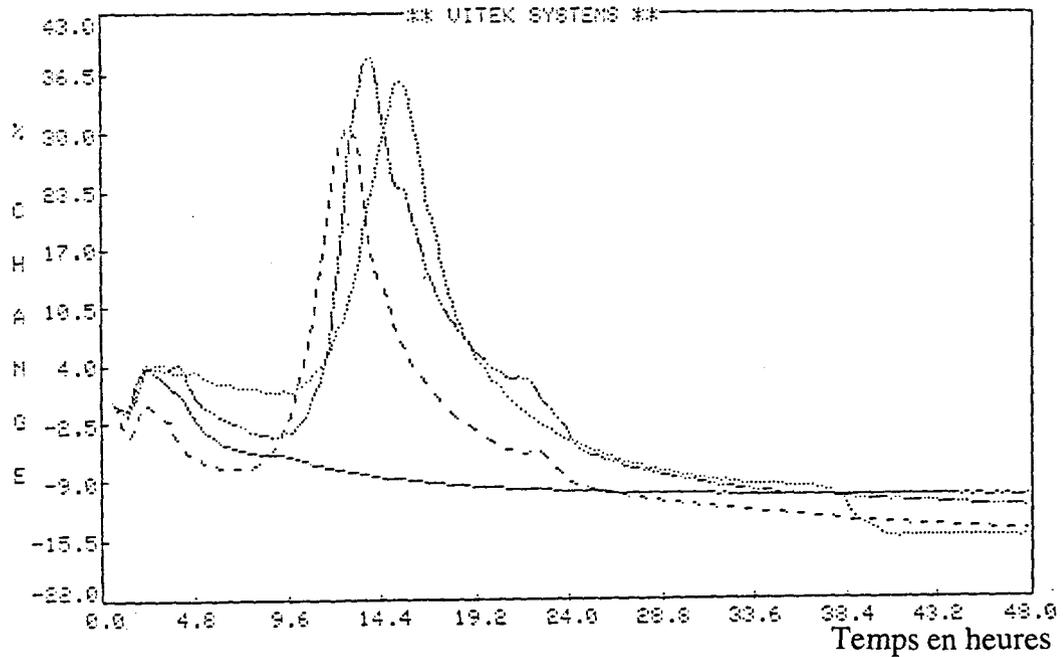


Figure 27: Signal typique de *Listeria* en impédancemétrie en présence de cultures mixtes

(\_\_\_\_\_ : Témoin milieu; ..... : *L. monocytogenes* 4b 19115;  
 ..... : *L. monocytogenes* 1/2c 86201; ..... : *L. innocua* 6b 87/5667).

Origine des échantillons n= 248	<u>Répartition des fréquences des échantillons positifs</u>			
	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
Usine A (n = 41)	13 <sup>a</sup> (68%) <sup>b</sup>	6 (32%)	0 ( 0%)	0 (0%)
Usine B (n = 20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Usine C (n = 12)	0 (0%)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Usine D (n = 4)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
Usine E (n = 86)	4 (50%)	3 (37%)	0 (0%)	1 (13%)
Usine F (n = 37)	5 (29%)	7 (41%)	2 (12%)	3 (18%)
Supermarché (n = 48)	2 (50%)	1 (25%)	1(25%)	0 (0%)
Total	27	20	3	4

Tableau 22: Répartition des fréquences des espèces de *Listeria* isolées des prélèvements d'environnement.

Légende:

a = fréquence absolue des échantillons positifs

b = fréquence relative des échantillons positifs

Type d'usine	Nature des échantillons prélevés	Nombre d'échantillons prélevés	Nombre d'échantillons positifs
Usine A	Sols	13	9
	Jonction sol/mur	3	2
	Bouches d'égout	2	1
	Bacs	2	1
	Matériel	21	6
Usine B	Sols	6	0
	Jonction sol/mur	4	0
	Bouches d'égout	3	0
	Bacs	2	0
	Matériel	5	0
Usine C	Sol	1	0
	Bacs	4	1
	Bouches d'égout	2	1
	Matériel	5	0
Usine D	Balayures	2	2
	Résidus	2	2
Usine E	Sols	17	1
	Jonction sol/mur	19	0
	Bouches d'égout	18	5
	Matériel	18	1
	Divers	14	1
Usine F	Sols	10	5
	Bouches d'égout	6	2
	Matériel	21	6
Super marché	Planches	6	1
	Couteau/Trancheur	26	1
	Plat présentation	1	1
	Matériel	15	1
Total		248	50

Tableau 23: Nature et origine des échantillons contaminés par *Listeria*.

Les prélèvements de l'usine B ne contiennent pas de *Listeria* alors que ceux de l'usine C sont positifs exclusivement en *L. innocua*. Le quai de livraison des matières premières, la salle des ingrédients ainsi que la laverie représentent les zones les plus contaminées. Nous avons également isolé cette espèce à partir d'un bac propre en attente d'usage. Pour l'usine D, 100% des échantillons sont positifs avec une forte présence de *L. monocytogenes* essentiellement dans les résidus et les balayures qui constituent ainsi une source potentielle de contamination des produits finis. Tous les prélèvements de l'usine E contaminés par *L. monocytogenes* (4/8 positifs) proviennent des bouches d'égout dont l'une est située dans la salle d'emballage des produits finis. La création d'aérosols doit être évitée dans ces conditions car les produits ne sont pas protégés. *L. innocua* et *L. welshimeri* sont également isolées. Les quatre espèces de *Listeria* rencontrées lors de ces campagnes sont présentes dans les échantillons de l'usine F à des taux variables. *L. innocua* et *L. monocytogenes* sont les plus nombreuses. Dans le cas de l'hypermarché, très peu d'échantillons contiennent des *Listeria* (8%) avec cependant la présence de *L. monocytogenes* dans 2/4 des prélèvements positifs. Les échantillons provenant des stands de charcuterie sont les plus contaminés car ils contiennent *Listeria* dans 3/4 des prélèvements positifs alors que la proportion est de 1/4 pour ceux obtenus à partir des stands de crèmerie.

Il ressort de l'analyse de tous ces résultats que les sols et les bouches d'égouts sont les endroits les plus contaminés par *Listeria* (Figure 28). Les récipients de récupération, les machines ainsi que divers accessoires sont contaminés dans des proportions semblables alors que les jonctions entre les sols et les murs présentent moins de *Listeria*.

### III-3 2 2 PAR LA METHODE DE L'IMPEDANCEMETRIE

Sur les 50 échantillons positifs, la méthode impédancemétrique a permis d'en détecter 47. Parmi ceux-ci cinq échantillons détectés tardivement présentent des courbes non typiques de *Listeria*. Les isolements du contenu des cupules correspondantes ont permis d'en confirmer 4 sur la gélose Palcam et un sur la gélose TSA (les isolements sur le Palcam sont négatifs). Trois échantillons ne donnent pas de signal caractéristique de *Listeria* pendant les 48 heures de détection que nous nous sommes fixées. Pour ces échantillons le contenu des cupules ne vire pas au noir (test présomptif de la présence de *Listeria*) et les isolements sur la gélose Palcam sont négatifs. Deux autres sont détectés puis confirmés en impédancemétrie alors qu'ils sont négatifs par la méthode de référence. Les échantillons négatifs présentent le plus souvent soit des courbes plates, soit des courbes correspondantes à la culture d'autres microorganismes mais très distinctes de celles de *Listeria* (Figure 29 et 30).

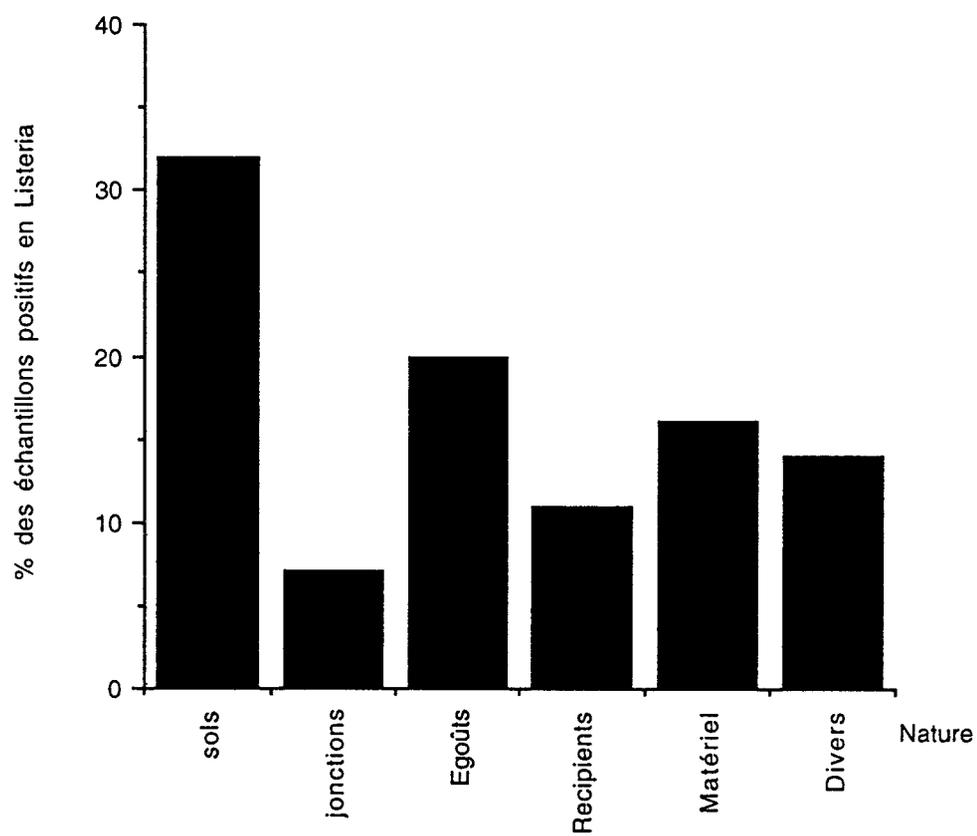


Figure 28: Répartition des échantillons positifs en Listeria en fonction de leur nature.

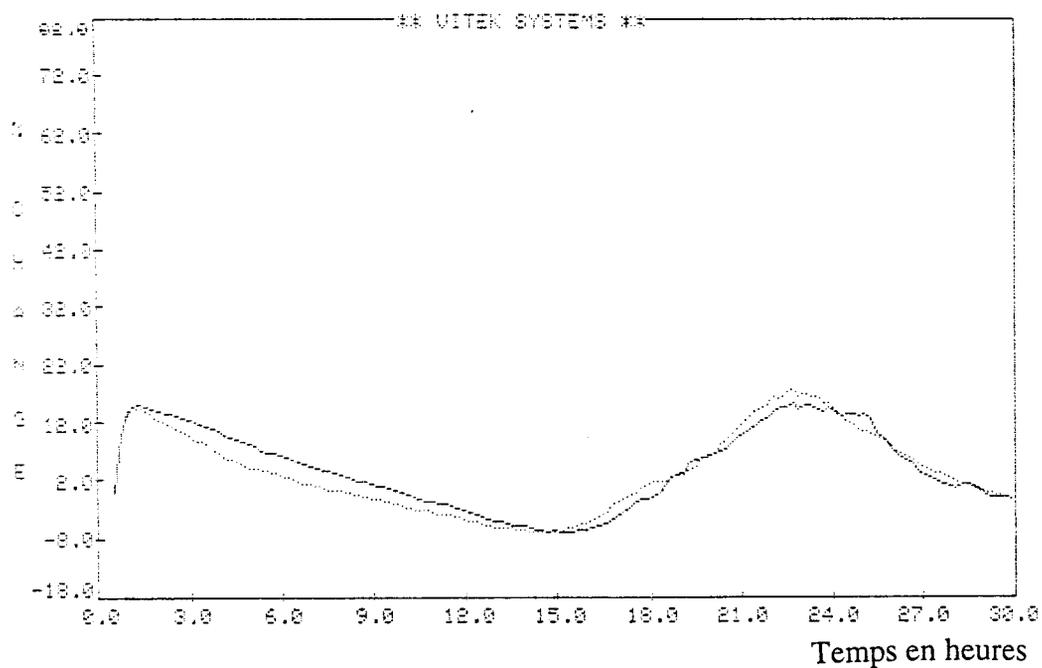


Figure 29: Signal non typique des microorganismes résistants à la sélectivité du milieu impédancemétrique.(\_\_\_\_\_ : Essai 1; ..... : Essai 2).

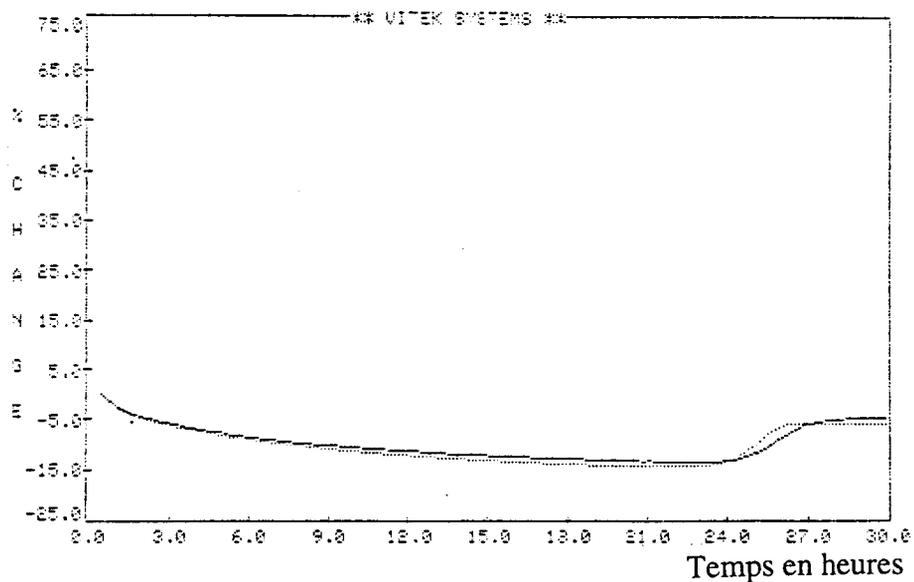


Figure 30: Signal non typique des microorganismes résistants à la sélectivité du milieu impédancemétrique.(\_\_\_\_\_ : Essai 1; ..... : Essai 2).

La répartition dans le temps des fréquences de détection des échantillons positifs est de 24 heures (45%), 30 heures (82%) et 48 heures (94%). Ces temps incluent la durée d'enrichissement et de détection .

A partir des résultats repris dans le Tableau 24, la sensibilité calculée pour chacune des deux méthodes est de 100% à cause de l'absence de faux positifs. Par contre, la spécificité de la méthode AFNOR V08 055 est de 98% alors qu'elle est de 94% pour l'impédancemétrie.

### III-4 CARACTERISATION DE *LISTERIA* PAR LA CPG

En fonction des indices de similarités (IS), les réponses sont classées comme suit: 37/43 excellentes ( $0,6 \leq IS < 1$ ) et 6/43 mauvaises ( $0,3 < IS$ ). Dans ce dernier groupe, on note dans l'ordre des proportions *L. seeligeri* (4/4), *L. welshimeri* (1/2) et *L. monocytogenes* (1/16). Les profils d'acides gras correspondants sont semblables à celui de *B. coagulans* (souches 38A, 42F et 16F) et *L. monocytogenes* (souches 39F, 40F et 41F). Les souches de *L. innocua* présentent par contre des indices de similarités importantes (Tableau 25). Cependant aucune espèce dans le premier groupe n'est correctement identifiée. Tous les chromatogrammes se confondent systématiquement soit à celui de *L. monocytogenes* (29/37) soit à celui de *B. coagulans* (8/37).

16 types d'acides gras à chaînes linéaires saturées ou insaturées, ramifiées ou non, comprenant un nombre d'atomes de carbone pair et impair de 10 à 19 sont rencontrés. Leur proportion est variable et ils ne sont pas présents chez toutes les espèces testées (Tableau 26). *L. monocytogenes* et *L. innocua* présentent des résultats équivalents. Tous les acides gras identifiés sont représentés chez ces deux espèces. Par contre *L. seeligeri* ne possède pas l'acide gras 19:0 Anteiso tandis que chez *L. welshimeri*, les acides gras 12:0, 13:0 Anteiso, 16:1  $\omega$ 7c et 18:0 Anteiso/18:2 $\omega$ 6,9c sont absents. Les chaînes carbonées saturées sont plus nombreuses que les insaturées. On compte au maximum deux double liaisons non conjuguées, présentes exclusivement dans la structure à 18 carbones c'est à dire 18:2 $\omega$ 6,9. Les autres avec une seule insaturation sont 16:1 $\omega$ 7 et 18:1 $\omega$ 9. Toutes ces doubles liaisons possèdent l'isomérisation *cis*.

Le pourcentage de chaque acide gras, calculé à partir du rapport de leur surface sur la surface totale des pics pour un échantillon donné, montre que les chaînes carbonées 15:0 Anteiso et 17:0 Anteiso sont les plus abondantes suivies de leurs isomères Iso (Tableau 27). Les acides gras représentés dans la proportion d'au moins 1% sont constitués par 16:0, 16:0 Iso et 14:0.

		AFNOR V08 055		Total
		+	-	
Impédancemétrie	+	45	2	47
	-	3	198	201
Total		48	200	248

Tableau 24: Comparaison des résultats bruts des méthodes AFNOR V08 055 et impédancemétrie.

Espèces	Nombre	Identification de <i>Listeria</i> en CPG	
		Excellent <sup>a</sup>	Mauvais <sup>b</sup>
<i>L. monocytogenes</i>	16	15	1
<i>L. innocua</i>	21	21	0
<i>L. welshimeri</i>	2	1	1
<i>L. seeligeri</i>	4	0	4
Total	43	37	6

Tableau 25: Identification de *Listeria* en chromatographie phase gaz

Légende:

a: Excellent  $0,6 \leq IS < 1$ ; b: Mauvais  $0,3 < IS$  avec IS= Indice de similarité.

Acides gras identifiés	<u>% des types d'acides gras identifiés en fonction des espèces</u>			
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
10:0	12	10	25	50
12:0	75	86	100	-*
13:0 Anteiso	25	24	50	-*
14:0 Iso	94	100	100	100
14:0	94	100	100	100
15:0 Iso	100	100	100	100
15:0 Anteiso	100	100	100	100
16:0 Iso	100	100	100	100
16:1 $\omega$ 7c	62	67	25	-*
16:0	100	100	100	100
17:0 Iso	100	100	100	100
17:0 Anteiso	100	100	100	100
18:0 Anteiso/18:2 $\omega$ 6,9c	50	43	25	-*
18:1 $\omega$ 9c	87	95	100	50
18:0	81	86	50	50
19:0 Anteiso	69	76	-*	50

Tableau 26: Proportions des différents types d'acides gras rencontrés par espèce de *Listeria*

Légende:

\*: Absence de l'acide gras correspondant

---

 % de chaque pic par rapport à la surface totale des pics par souche\*
 

---

Espèces	14:0	15:0 Iso	15:0 Ante <sup>+</sup>	16:0 Iso	16:0	17:0 Iso	17:0 Ante
1A	1	11	43	2	3	4	33
2A	1	11	41	2	3	5	36
3A	1	9	43	2	3	4	35
4A	2	12	44	2	3	4	31
5A	1	10	41	2	3	4	38
6A	1	10	43	2	3	3	34
7A	1	9	41	2	2	4	38
8A	1	10	43	2	2	4	39
9A	1	11	44	2	3	4	34
10A	1	10	43	2	3	4	36
11A	1	11	45	2	2	4	34
12F	1	9	42	2	3	3	37
13F	1	9	44	2	3	3	35
14F	1	9	43	2	3	3	35
15F	1	10	44	1	3	3	35
16F	2	11	56	1	3	2	23
17A	0,9	10	40	2	2	4	37
18A	1	10	45	2	2	4	34
19A	0,8	10	39	2	2	4	39
20A	1	11	44	2	2	4	34
21A	0,8	10	42	2	2	4	38
22A	1	11	43	2	2	4	35
23A	1	11	42	2	2	4	35
24A	1	11	43	2	2	4	34
25A	1	11	44	2	2	4	33
26A	1	11	41	2	2	4	36
27F	1	11	45	3	3	4	33
28F	1	12	44	2	2	4	32
29F	1	9	41	2	3	4	38
30F	1	9	42	2	3	4	36
31F	2	10	49	2	3	3	29
32F	1	12	42	2	3	4	33
33F	1	11	42	2	3	4	33
34F	1	14	45	2	3	4	29
35F	1	13	43	2	3	4	31
36G	1	11	42	2	3	4	34
37E	1	11	42	2	3	4	35
38A	2	11	55	2	4	2	22
39F	2	11	53	1	3	3	25
40F	2	11	53	2	3	2	24
41F	2	10	50	2	3	3	28
42F	3	11	55	2	3	2	23
43F	1	9	41	2	3	4	38

---

 Tableau 27: Proportion de chaque pic identifié chez les espèces de *Listeria* testées.

Légende: \* Seuls les pics dont le pourcentage par rapport à la surface totale des pics chez une espèce donnée est  $\geq 1$  sont retenus.

+ : Anteiso

Les autres sont en trace c'est à dire moins de 1%. Ces observations se généralisent à toutes les espèces ou souches de *Listeria* examinées. Les acides gras 15:0 Anteiso et 17:0 Anteiso sont en concentration, supérieure à leurs isomères Iso dans les rapports respectifs de 4 et 9-10. Chez *L. monocytogenes* et *L. innocua*, en général les formes 15:0 Anteiso sont dans les proportions de 40-49% alors que les taux sont de 29-39% pour les acides gras 17:0 anteiso. Chez *L. seeligeri* par contre ces mêmes composés sont dans les concentrations de 50-55% et 22-28%. Le logarithme des ratios 15:0 Anteiso/15:0 Iso et 17:0 Anteiso/17:0 Iso montre une relation de proportionalité croissante entre ces deux types d'acides gras (Figure 31). *L. monocytogenes* et *L. innocua* sont préférentiellement regroupées dans la zone de  $\log(17:0 \text{ Anteiso} / 17:0 \text{ Iso}) \leq 0,66$  alors que *L. seeligeri* et *L. welshimeri* sont reparties dans la partie  $\log(17:0 \text{ Anteiso} / 17:0 \text{ Iso}) \geq 0,66$ . Ces valeurs cibles caractérisent assez bien l'identification de *Listeria* par la CPG.

Afin de minimiser l'erreur-type sur la détermination des distances euclidienne, les clusters sont formés avec les 37 souches dont les indices de similarités sont compris entre 0,6 et 1 (soit 86% des échantillons). Les résultats du Dendrogram montrent que toutes les souches testées appartiennent au même genre (Figure 32). Mais cette méthode est incapable de différencier les espèces entre elles. Ainsi par exemple *L. welshimeri* 43F serait la même souche que *L. monocytogenes* 3A. Selon la classification donnée, les échantillons du groupe I sont de la même souche alors qu'ils sont différents de ceux des groupes II, III, IV, V et VI. Les deux espèces du groupe VI sont de biotype semblable mais appartiennent au même genre que les échantillons des autres groupes. *L. innocua* 36G, 32F et 33F isolées dans deux usines différentes seraient identiques. Il en est de même pour *L. innocua* 26A, 22A, 23A et 37F.

La similarité entre des paires de souches a permis de faire certains regroupements dans l'exploitation des résultats du 2-D Plot. Des échantillons du même environnement industriel forment un même cluster mais souvent des recoupements existent avec des échantillons d'origines différentes (Figure 33). Les échantillons 34F et 35F sont identiques et sont clairement éloignés de 31F, qui provient d'un prélèvement différent. Mais avec ces données, il est prématuré de remonter aux sources de contamination par *Listeria* dans ces différentes usines. La collecte d'informations supplémentaires est nécessaire.

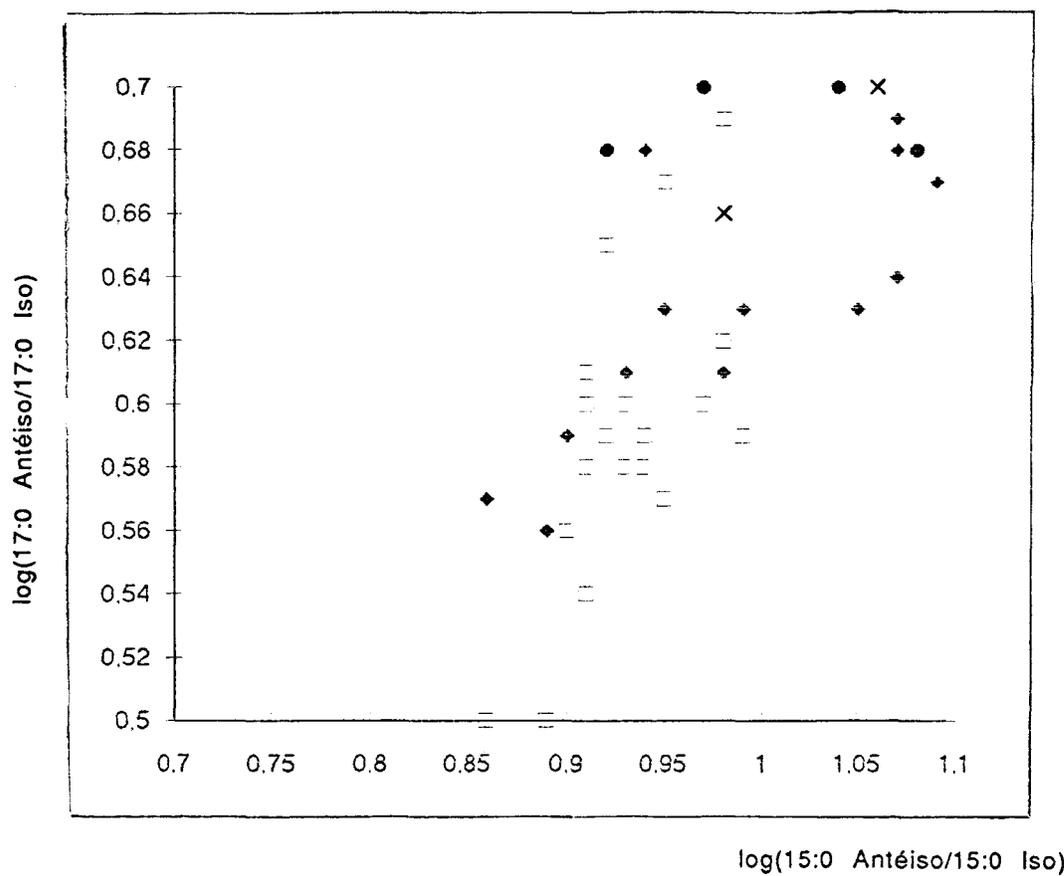


Figure 31: Evolution du logarithme des ratios des formes isomériques des acides gras C17 et C15.

- ◆ *L. monocytogenes*
- ◻ *L. innocua*
- × *L. welshimeri*
- *L. seeligeri*

EXCLUSION DISTANCE

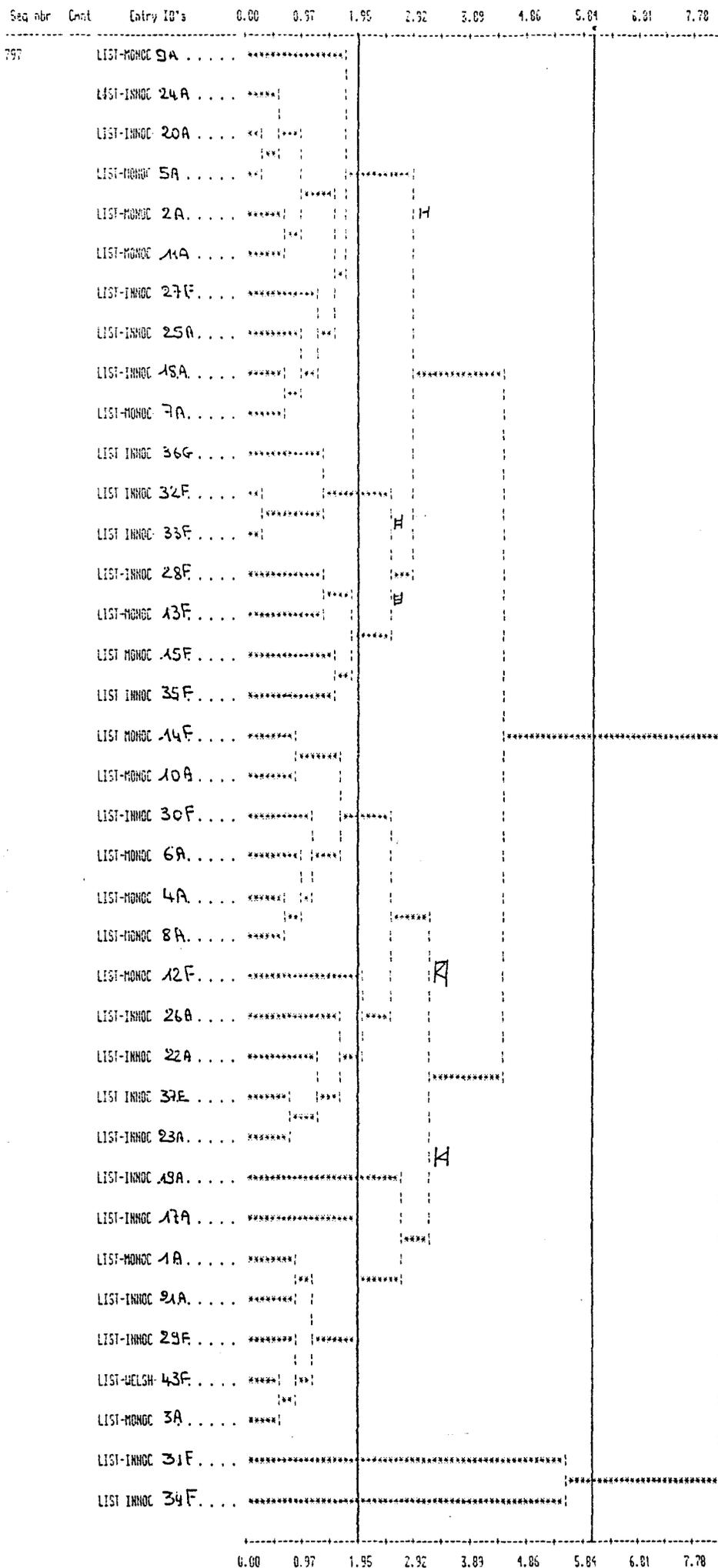
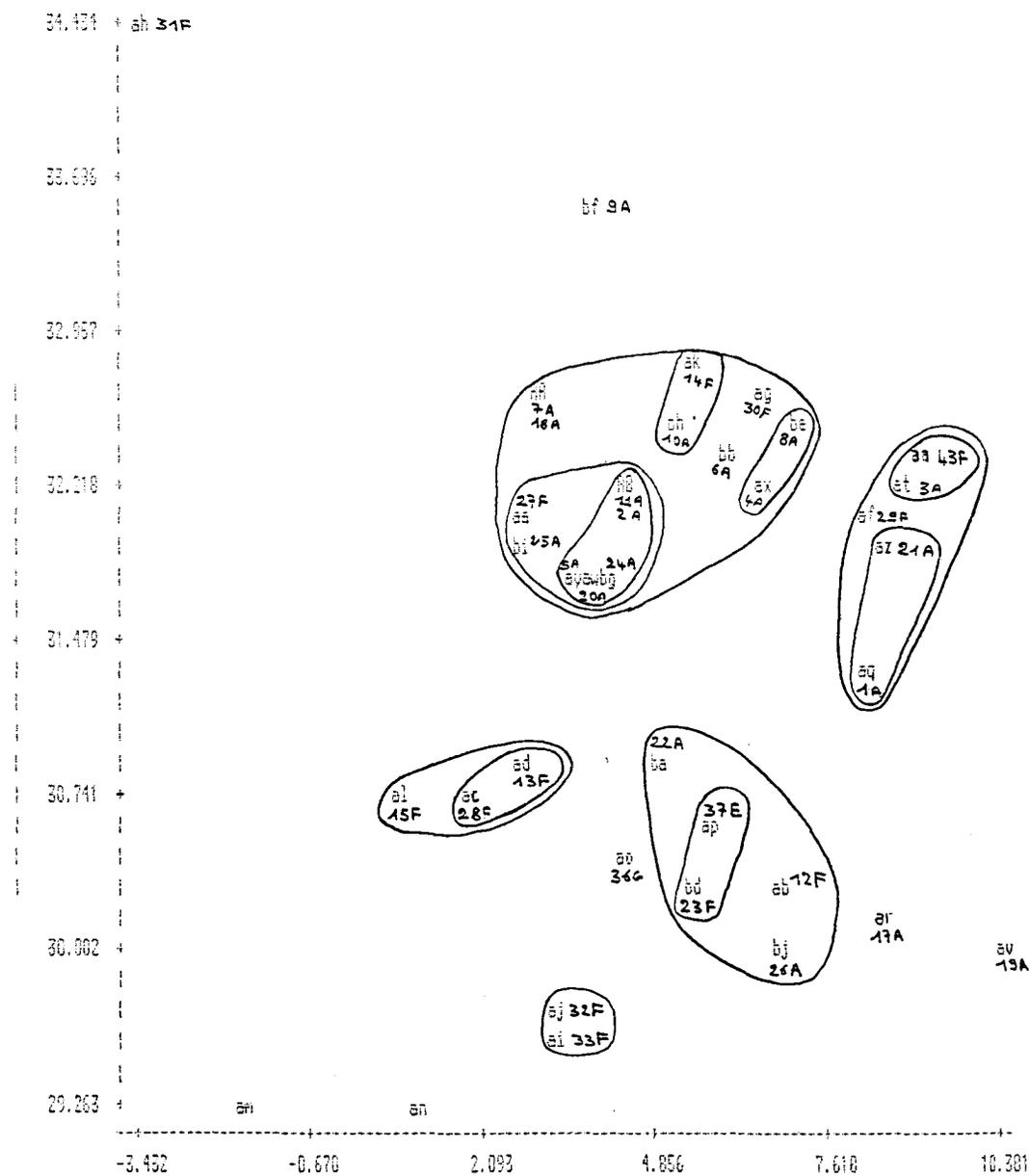


Figure 32: Regroupement des souches de *Listeria* d'environnement à l'aide du programme Dendrogram.

X-axis = Principal Component 1 Y-axis = Principal Component 2

Total samples used: 37

MEAN-X: 4.600 SD-X: 2.964  
 MEAN-Y: 31.402 SD-Y: 1.234



- aa List innoc 23
- ab List monoc 24
- ac List innoc 26
- ad List monoc 27
- ae List welsh 28
- af List innoc 29
- ag List innoc 31
- ah List innoc 32
- ai List innoc 33
- aj List innoc 33
- ak List monoc 35
- al List monoc 37
- am List innoc 38
- an List innoc 40
- ao List innoc 41
- ap List innoc 42
- aq List monoc 1
- ar List innoc 2
- as List monoc 3
- at List monoc 4
- au List innoc 5
- av List innoc 6
- aw List innoc 7
- ax List monoc 8
- ay List monoc 9
- az List innoc 10
- ba List innoc 11
- bb List monoc 12
- bc List monoc 13
- bd List innoc 14
- be List monoc 15
- bf List monoc 16
- bg List innoc 17
- bh List monoc 18
- bi List innoc 19
- bj List innoc 20
- bk List monoc 21

SAMPLE GROUPS:

RA = bc au  
 RB = bk as

Figure 33: Formation des clusters avec des souches de *Listeria* d'environnement à l'aide du programme 2D-Plot.

### III-5 LES INDICATEURS DE *LISTERIA*

Sur les 95 échantillons analysés pour cette expérience, 32 (34%) sont contaminés par *Listeria* dont 19% de *L. innocua*, 14% de *L. monocytogenes* et 1% de *L. seeligeri* (Tableau 28). Parmi ces 32 prélèvements positifs, 5 présentent des numérations de 1 à 7 cfu/cm<sup>2</sup> les autres contiennent moins de 1cfu/cm<sup>2</sup> selon la sensibilité de la méthode utilisée. La répartition des espèces isolées est très hétérogène. Les usines A et F sont contaminées essentiellement par *L. monocytogenes* alors que dans l'usine C, 100% des échantillons contaminés sont représentés par *L. innocua*. *L. seeligeri* est faiblement présente dans les quatre usines.

Aucun échantillon analysé ne contient des Salmonelles. Les dénombrements par la méthode spiral est de l'ordre de 2 à 10<sup>6</sup> cfu/cm<sup>2</sup>. Selon les tendances dégagées, la répartition des différents groupes de microorganismes dans 6 intervalles choisis arbitrairement révèle en général que dans les prélèvements les plus faiblement contaminés, on retrouve dans l'ordre des fréquence les moisissures, les coliformes totaux, les levures et les germes aérobies mésophiles. C'est la situation inverse qui se produit pour échantillons les plus contaminés (Figure 34).

Ainsi pour les prélèvements apparemment "propres" avec moins de 2cfu/cm<sup>2</sup>, la flore dominante est représentée par les moisissures et les coliformes alors que pour les échantillons contenant moins de 10<sup>3</sup> cfu/cm<sup>2</sup> on retrouve dans des quantités équivalentes les moisissures et coliformes puis, plus faiblement les levures. A partir de 10<sup>3</sup> cfu/cm<sup>2</sup> et pour des valeurs supérieures, la flore présente est dominée par les germes aérobies mésophiles et les levures (Tableau 29). Lorsque la population des germes aérobies mésophiles augmente de 10 à 6.10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup>, la fréquence d'isolement de *Listeria* varie respectivement de 7 à 50%. Dans le cas des levures, ces taux varient de 6 à 68% dans les intervalles respectifs < 2 cfu/cm<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup>-10<sup>4</sup> cfu/cm<sup>2</sup>. Dans le cas des autres indicateurs, l'évolution des fréquences d'isolement de *Listeria* est inconstante (Figure 35). Cependant l'analyse  $\chi^2$  des résultats montre qu'aucun des 4 indicateurs pris individuellement n'est significativement liée à la présence de *Listeria* (Tableau 29). Par contre en les répartissant dans 2 intervalles choisis arbitrairement, l'incidence de *Listeria* croit significativement lorsque les populations des germes aérobies mésophiles et des levures augmentent de 10<sup>3</sup> à 6.10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> avec respectivement p > 0,005 et p > 0,01 (Tableau 30).

Référence des échantillons	Nombre et % des échantillons positifs en <i>Listeria</i>			Total
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	
A (n = 20)	7 (8%)	2 (2%)	0 (0%)	9 (10%)
C (n = 25)	5 (5%)	2 (2%)	1 (1%)	8 (8%)
F (n = 25)	0 (0%)	9 (10%)	0 (0%)	9 (10%)
G (n = 25)	1 (1%)	5 (5%)	0 (0%)	6 (6%)
Total (n = 95)	13 (14%)	18 (19%)	1 (1%)	32 (34%)

Tableau 28: Répartition de *Listeria* dans l'environnement de 4 usines alimentaires.

Légende

n = Nombre d'échantillons analysés.

A = Usine A; C = Usine C; F = Usine F; G = Usine G.

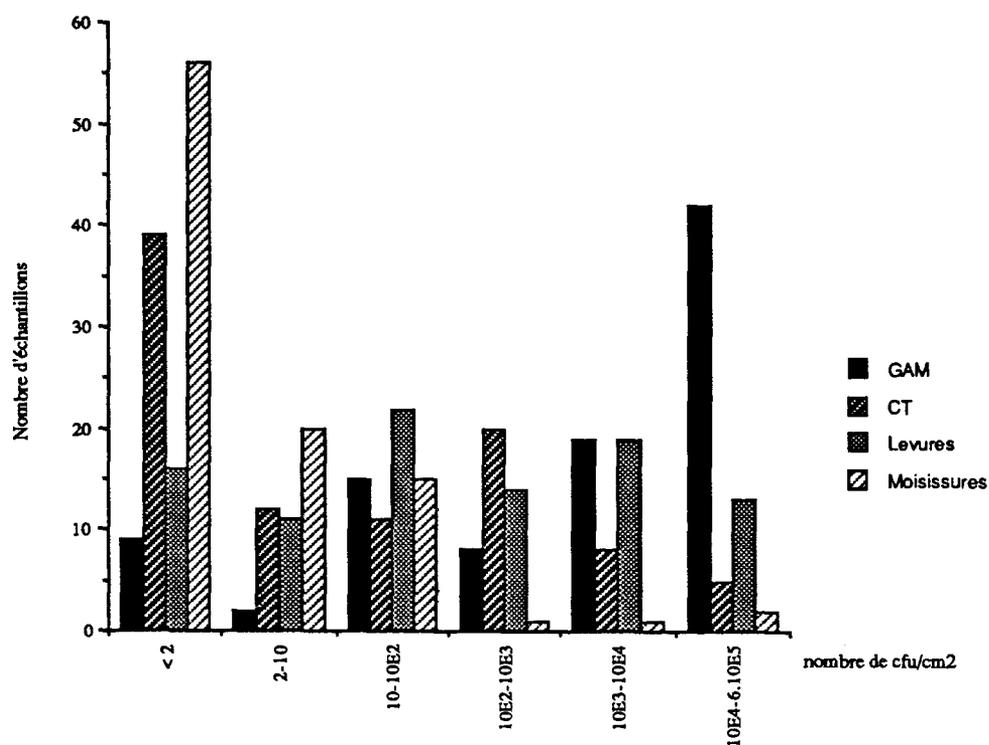


Figure 34: Répartition des fréquences absolues des indicateurs en fonction de la charge des échantillons.

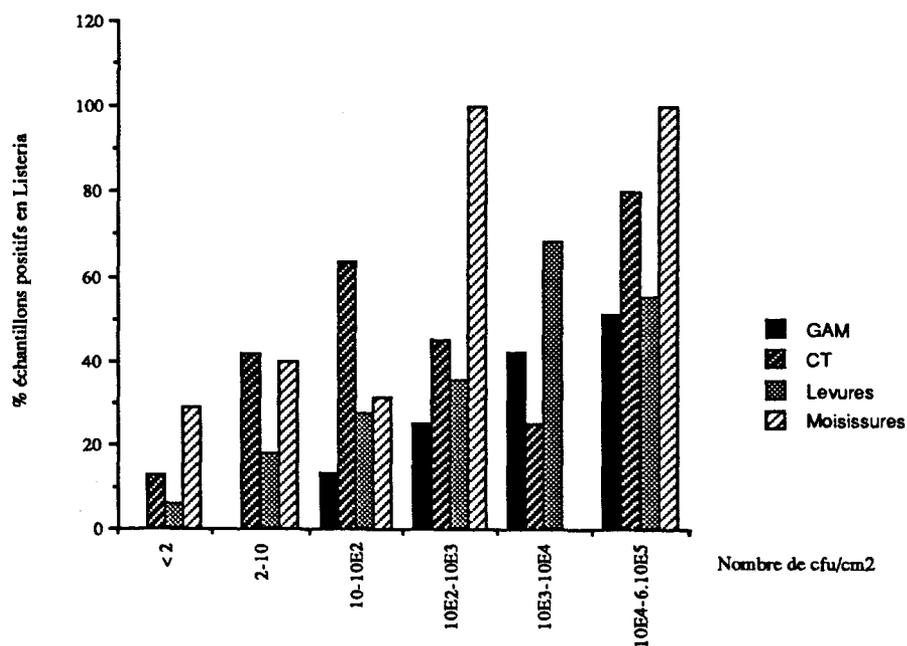


Figure 35: Fréquence d'isolement de Listeria en fonction de la charge des indicateurs.

Fréquence de *Listeria* et des indicateurs dans les échantillons analysés

Indicateurs cfu/cm <sup>2</sup>	<u><i>Listeria.</i></u>	<u>GAM</u>	<u><i>Listeria</i></u>	<u>CT</u>	<u><i>Listeria</i></u>	<u>Levures</u>	<u><i>Listeria</i></u>	<u>Moisissures</u>
	nombre. positifs	numérat cfu/cm <sup>2</sup>	nombre positifs	numérat cfu/cm <sup>2</sup>	nombre positifs	numérat cfu/cm <sup>2</sup>	nombre positifs	numérat cfu/cm <sup>2</sup>
< 2	0	9	5	39	1	16	15	56
2-10	0	2	5	12	2	11	9	20
10-10 <sup>2</sup>	1	15	7	11	6	22	5	15
10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	2	8	9	20	5	14	1	1
10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	8	19	2	8	13	19	0	1
10 <sup>4</sup> -6.10 <sup>5</sup>	21	42	4	5	5	13	2	2
Total	32	95	32	95	32	95	32	95
$\chi^2$	9,40		8,85		8,40		3,44	
P	0,093		0,114		0,163		0,634	

Tableau 29: Relation entre le dénombrement des indicateurs et la présence de *Listeria* dans des prélèvements d'environnement.

Légende

GAM = Germes Aérobie Mésophile; CT = Coliformes Totaux; numérat = numération;  
 $\chi^2$  = khi-deux calculé; p = degré de signification de la différence observée.



Indicateurs	Fréquence d'isolement de <i>Listeria spp.</i>			
	numération des indicateurs (cfu/cm <sup>2</sup> )	échantillons positifs	$\chi^2$	P
GAM	< 2 à 10 <sup>3</sup>	1	8.40	0.008
	10 <sup>3</sup> à 6.10 <sup>5</sup>	31		
CT	< 2 à 10 <sup>3</sup>	17	1.50	0.22
	10 <sup>3</sup> à 6.10 <sup>5</sup>	15		
Levures	< 2 à 10 <sup>3</sup>	9	5.30	0.02
	10 <sup>3</sup> à 6.10 <sup>5</sup>	23		
Moisissures	< 2 à 10 <sup>3</sup>	29	1.20	0.27
	10 <sup>3</sup> à 6.10 <sup>5</sup>	3		

Tableau 30: Relation entre la présence de *Listeria* et la numération des indicateurs repartis dans deux intervalles choisis arbitrairement.

#### Légende

GAM = Germes Aérobie Mésophiles; CT = Coliformes Totaux;

$\chi^2$  = khi-deux calculé; p = degré de signification de la différence observée.

Pour chaque indicateur, le nombre de *Listeria* présent dans les intervalles < 2-6.10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup>-6.10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> est confronté. Les paramètres statistiques ( $\chi^2$ , P) sont calculés.

# DISCUSSION

## IV DISCUSSION

### IV-1 MILIEU SELECTIF IMPEDANCEMETRIQUE

#### IV-1 1 SELECTION DE LA BASE

Certains milieux sont plus appropriés en impédancemétrie que d'autres. Cela est probablement dû au fait que les microorganismes utilisent des voies métaboliques différentes. Il en résulte la formation de métabolites plus ou moins chargés d'où l'intérêt de sélectionner dans une première étape un milieu convenable. Pour cette expérience, nous avons travaillé sur des milieux liquides contrairement à certains auteurs (Griffiths et Phillips, 1984; Piton et Dasen, 1988; Franken et von der Zouwen, 1993; Connolly et coll., 1994) afin de faciliter les manipulations et gagner ainsi du temps en évitant la préparation préalable des modules. Par ailleurs, Okibo et Richardson (1985) ont au cours de leur travaux, préféré le milieu liquide au détriment du milieu gélosé car de faibles variations étaient obtenues sur ce dernier alors que Khayat et Richardson (1986) ont signalé que les TD peuvent être plus longs lorsqu'on utilise un milieu gélosé en impédancemétrie, probablement à cause d'une mauvaise diffusion des métabolites dans le milieu.

Nous avons observé, que les milieux de base empirique utilisés traditionnellement pour la recherche de *Listeria* ne sont pas toujours adaptés dans le cas de l'impédancemétrie. Gibson (1987) a fait les mêmes observations lors de la recherche de *Clostridium botulinum*. Ainsi Firstenberg et Tricarico (1983b) puis Bishop et coll. (1984) en modifiant la formulation de la gélose PCA par augmentation de la concentration des ingrédients, enregistraient de bonnes corrélations entre les dénombrements et les TD. Ceci leur a permis de prédire la durée de vie de produits laitiers. D'autres travaux ont confirmé par la suite que des milieux spéciaux formulés pour la mesure de la conductance produisaient des courbes de meilleure qualité que celles obtenues sur les milieux usuels (Zindulis, 1984; Adams et coll., 1989).

Ces résultats ne sont pas surprenants car l'impédancemétrie et la microbiologie traditionnelle sont basées fondamentalement sur des principes différents. L'impédancemétrie est dépendante de l'amplification conjointe de la croissance et des activités métaboliques microbiennes alors que la microbiologie classique utilise essentiellement la production de biomasse visible.

Les suppléments sélectifs usuellement employés dans les milieux d'isolement de *Listeria*, ne sont pas non plus convenables en impédancemétrie. Leur présence perturbe considérablement les métabolismes bactériens et les détections se trouvent affectées. Ainsi on observe soit une inhibition complète de cette activité (pas de TD) soit son ralentissement (TD longs). Or l'impédancemétrie dépend beaucoup des cinétiques de croissance microbienne. Des substances inhibitrices qui n'ont pas d'effet dans la technique classique peuvent être incompatibles en impédancemétrie (Firstenberg, 1986). Ces résultats peuvent cependant inspirer d'autres voies d'application de cette technique par exemple en industrie laitière pour la formulation de starters standardisés et la détection d'antibiotiques dans le lait cru ou en médical pour l'établissement des antibiogrammes.

Phillips et Griffiths (1989) ont testé 11 milieux pour la recherche de *Listeria* en mesurant la capacitance. Le milieu AC présentait les meilleurs résultats. Trois souches de *Listeria* sur quatre ont été détectées. Mais l'irrégularité des courbes observées nécessitait des études supplémentaires. Les résultats obtenus avec les milieux sans leur supplément sélectif confirment bien ces observations. Mais la présence de LiCl à la concentration de 15 g/l dans les milieux Oxford et Palcam conduit souvent à une inhibition de *Listeria* alors que de tels résultats ne sont pas observés avec le MVJ qui ne contient dans sa base que 3 g/l de LiCl. Ces inhibitions peuvent s'expliquer par les phénomènes d'hypertonie provoqués par les fortes concentrations de LiCl dans le milieu.

Le chlorure de lithium était originellement employé pour l'isolement de *Staphylococcus aureus* (Ludlam, 1949; Zebovitz et coll., 1955; Vogel et Johnson, 1960; Baird-Parker, 1962; Crisley et coll., 1964) puis des *Salmonelles* (Lambin et German, 1969). C'est McBride et Gerard (1960) qui ont pour la première fois introduit cette substance dans la gélose LPM pour isoler *Listeria*. Depuis lors, elle est usuellement employée dans les milieux sélectifs pour *Listeria* sans que l'on ait suffisamment de données sur son mécanisme d'action. Leighton (1979) puis Loessner et coll. (1988) lors de leurs travaux ont soupçonné le LiCl d'être à l'origine des inhibitions observées. van Netten et coll. (1988) ont trouvé que l'association du LiCl et de l'acide nalidixique inhibait plusieurs souches de *L. monocytogenes*. Par contre, Cox et coll. (1990) ont démontré que le LiCl utilisé à la concentration de 20 g/l ou moins ne présentait pas d'effet significatif sur les cultures de *L. monocytogenes*. Des résultats similaires ont été obtenus par Bolton (1990) qui a montré que le LiCl employé à 15g/l dans le milieu WIBG, retardait le temps de détection de *L. monocytogenes* en impédancemétrie indirecte de seulement 1 à 2 heures selon la souche utilisée. Cette concentration a été revue puis baissée à 10g/l (Cox et coll., 1991) et à 5g/l (Lee et McClain, 1986).

Fraser et Sperber (1988) pour la mise au point de bouillon d'enrichissement pour *Listeria*, utilisaient 3 g/l de LiCl même si Cox et coll. (1990) ont démontré qu'à cette concentration, la multiplication de flore de compétition telle que *E. faecalis* était seulement ralentie mais pas inhibée. Ces résultats variables et contradictoires des effets du LiCl montrent manifestement que des études approfondies sont nécessaires pour optimiser l'emploi de cette substance. Dans tous les cas, la présence de LiCl dans les milieux conduit à un ralentissement de la multiplication de *Listeria* et par conséquent à une augmentation du temps de génération. Le taux de croissance diminuant et en parallèle le temps de latence augmentant, la détection des *Listeria* se trouve retardée d'environ 3 heures selon la souche (Cox et coll., 1990).

Toutes les espèces de *Listeria* ne répondent pas de la même manière vis à vis des agents sélectifs. *L. seeligeri* et *L. ivanovii* sont très sensibles. Dans les essais effectués, elles sont soit inhibées soit détectées beaucoup plus tard. Hancock et coll. (1993) puis Baumgard et coll. (1994) ont observé des résultats similaires lors de la mise au point de milieu sélectif pour *Listeria* en impédancemétrie. Il serait intéressant d'analyser un plus grand nombre de ces espèces afin d'évaluer au mieux leur détection en impédancemétrie. L'importance des pourcentages de variation de capacitance varie elle aussi en fonction de l'espèce étudiée et même de la souche. Elle est élevée lorsque la cellule bactérienne testée se multiplie normalement. Ceci constitue un critère important dans le choix des milieux en impédancemétrie.

*Listeria* présente en général une courbe d'allure gaussienne avec un pic plus ou moins étroit. L'angle d'accélération est proche de 90° ce qui conduit à des courbes de bonnes qualité. Ce paramètre fut un critère de choix dans le développement d'un milieu de détection des microorganismes d'altération des produits à faible acidité (Coppola et Firstenberg, 1988). La phase de décélération est lente et progressive. A la fin du signal, la courbe ne revient pas toujours à la valeur initiale de la phase d'accélération. Des molécules d'ions résiduels mais aussi la polarisation des électrodes seraient responsables de ce phénomène.

Le milieu de base permettant une bonne détection de toutes les espèces testées est finalement l'Oxford sans le chlorure de lithium.

## IV-1 2 ROLE DU FER

Dans le milieu décrit ci-dessus, le fer est apporté sous forme de citrate de fer ammoniacal. Or dans les conditions de culture difficile, *Listeria* est incapable d'utiliser les métabolites intermédiaires du cycle de Krebs comme source d'énergie. Elle ne métabolise donc pas le citrate (Buchanan et Gibbons, 1974). Afin d'optimiser les conditions de culture de *Listeria* tout en défavorisant la multiplication de la flore compétitive telle que *E. faecalis* (Dallas et coll., 1991), nous avons tenté de remplacer le citrate de fer ammoniacal par une autre source de fer.

On remarque qu'en général, le fer a une importance capitale dans ce milieu sur la détection de *Listeria*. Son absence affecte l'allure des courbes qui devient atypique. Les trois substances étudiées peuvent servir de source de fer. Mais, le sulfate de fer conduit à une dérive importante au niveau de la ligne de base. Dans ce cas, la mesure du temps de détection et du pourcentage de variation de capacitance est peu précise contrairement à celle effectuée à partir de ligne de base stable et assez rectiligne (Dupont et coll., 1994). Le citrate de fer semble par contre mieux indiqué. Adams et coll. (1990) ont démontré que le citrate est reconnu par les cellules de *L. monocytogenes* et agit comme molécule inductrice porteuse du fer pour les réactions de fixation.

Le fer sert de cofacteur aux enzymes comme la catalase, la peroxydase ainsi qu'aux enzymes cytochromiques pour le transport séquentiel des électrons dans la chaîne respiratoire (Cowart et Foster, 1985; Cowart, 1987; Deneer et Boychut, 1992). Lorsque les cellules de *Listeria* subissent des lésions, l'activité de ces enzymes baisse ce qui les rend très sensibles aux radicaux oxygène, superoxyde et au peroxyde d'hydrogène (Martin et coll., 1976; Dallimer et Martin, 1988). Dans le but d'améliorer la détection de cellules de *L. monocytogenes* lésées, Martin et Katz (1993) ont utilisé le pyruvate pour neutraliser ces radicaux, et le thioglycolate pour réduire le potentiel d'oxydo-réduction. Cette situation renforce l'idée que la création de condition d'anaérobiose est favorable au recouvrement des cellules altérées (Knabel et coll., 1990).

Le fer possède également un rôle stimulateur (Welshimeri, 1963; Sword, 1966; Trivett et Meyer, 1971; Ranga et coll., 1991) dans la réparation des cellules lésées et dans la biosynthèse des enzymes insensibles aux inhibiteurs (Brisou, 1971). Il est recommandé dans les milieux de revivification de *Listeria* (Busch et Donnelly, 1992). Sa présence dans les milieux solides est favorable à la détection de *L. monocytogenes* (Hao et coll., 1987).

#### IV-1 3 FORMULATION DU SUPPLEMENT SELECTIF

L'utilisation de la méthode des plans d'expériences dans notre étude, pour la formulation du supplément sélectif présente plusieurs avantages sur la méthode classique. On fait varier les niveaux de tous les facteurs à la fois à chaque expérience. Cette manière de procéder conduit à une diminution du nombre des essais et des facteurs étudiés tout en tenant compte des interactions entre ces facteurs (Goupy, 1988). L'interprétation des résultats est rendue facile par l'existence d'un outil mathématique.

Si *Listeria* est résistante à la proflavine et à la nitrofurantoïne utilisées individuellement dans le milieu, leur association lui est par contre toxique. L'explication se trouverait au niveau du mécanisme moléculaire de l'action de ces antibiotiques (Briand, 1986). La proflavine peut s'intercaler entre les paires de bases des nucléotides ou se fixer à l'extérieur de la double hélice d'ADN. La présence du groupement aminé  $-NH_2$  permet de former des liaisons hydrogènes avec les hydroxyles  $OH^-$  des bases, stabilisant ainsi l'intercalation. La séparation des brins est rendue impossible en conséquence, l'ADN polymérase ou l'ARN polymérase ne peuvent plus se fixer. La réplication de l'ADN ainsi que sa transcription sont inhibées.

La nitrofurantoïne réagit elle aussi avec l'ADN bactérien et conduit à des phénomènes de mutation ou de réversion. Sur l'ARN, son effet peut conduire à la perturbation de la lecture de l'ARN messager des protéines inductrices par modification des ribosomes. Le métabolisme est également affecté au niveau du cycle de Krebs et de la glycolyse. Mais comme toutes les nitrofurannes, son association avec l'acide nalidixique et ses dérivés est antagoniste chez les entérobactéries. Leur effet peut donc s'annuler et permettre à ces bactéries de se multiplier. L'association de ces deux types d'antibiotiques est donc à proscrire dans les milieux de recherche de *Listeria*. La plupart des milieux d'enrichissement pour *Listeria* contenant de l'acide nalidixique, nous avons préféré abandonner la nitrofurantoïne.

Ainsi, le milieu de base Oxford sans LiCl additionné de Proflavine 21mg/l et de ceftazidime 20 mg/l offre les meilleurs résultats. Les courbes de *Listeria* sont préservées alors que la flore indésirable est éliminée.

## IV-2 LES CONDITIONS DE DETECTION DE *LISTERIA*

### IV-2 1 LE pH INITIAL DU MILIEU

L'action du pH sur le signal électrique des microorganismes se situe à deux niveaux: le milieu, l'activité physiologique de la cellule caractérisée par les échanges membranaires et le métabolisme. La disponibilité de certains nutriments dans le milieu est modifiée par l'équilibre ionique. Ainsi les ions ferreux sont par exemple complexés aux pH basiques. Sous cette forme, ces ions indispensables pour certaines réactions métaboliques sont difficilement utilisables. Cette carence ralentit la croissance des microorganismes et leur détection se trouve affectée.

Baernstein (1928) a souligné que la participation des acides aminés (presque tous sous forme de zwitterion dans les milieux biologiques à pH neutre) à la conductivité, dépend du flux des ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{H}^+$ . Mais les variations en concentration de ces ions affectent également la perméabilité membranaire. En milieu acide, les perméases cationiques sont saturées en ions hydrogènes, ce qui limite ou annule le transport des cations indispensables. En milieu basique, ce sont les ions hydroxyles qui saturent les perméases membranaires empêchant le transport des anions.

En étudiant l'effet des chocs de pH sur la survie de *L. monocytogenes*, Kroll et Patchett (1992) ont indiqué que des altérations cytoplasmiques pouvaient survenir confirmant ainsi les résultats des travaux de Bailey et coll. (1990) qui ont montré l'importance des systèmes tampons dans les milieux de culture. Nous n'avons pas trouvé utile l'emploi de tampons pour éviter la perturbation des signaux impédancemétriques. Le milieu est par ailleurs plus simple dans cette formulation.

Les réactions enzymatiques se font à un pH optimum en deçà et au delà duquel la cinétique est perturbée. Toute variation du pH cytoplasmique (ou extra-cellulaire) va donc entraîner un ralentissement de ces réactions et par conséquent la croissance. Nous avons trouvé que les valeurs de pH comprises entre 6,5 et 7 sont les meilleures conditions pour détecter *Listeria* en impédancemétrie. Par ailleurs, nous avons également constaté que la capacitance varie beaucoup plus avec le pH que la conductance, en accord avec les travaux de Firstenberg et Zindulis (1984).

Pour les mêmes inoculums, les très faibles pourcentages de variation de la conductance obtenus sont surprenants. Noble et coll. (1991) ont observé qu'en utilisant le Bactometer pour dénombrer les germes aérobies mésophiles, le coefficient de corrélation engendré

était nettement plus important en capacitance qu'en conductance. De même Spreekens et Stekelenburg (1986) puis Dumont et Slabyj (1994) ont indiqué qu'avec cet appareil, la mesure de la capacitance donnaient des détections rapides et des courbes de meilleure qualité que celles de la conductance. Indépendamment du type de milieu et de microorganisme utilisés, les faibles fréquences du courant qui alimentent ce système sont en faveur de la capacitance. Il existe donc des ambiguïtés sur l'usage du Bactometer pour la mesure de la conductance.

#### IV-2 2 ORIGINE DE LA VARIATION DE CAPACITANCE

La connaissance des principaux métabolites formés au cours d'une culture microbienne est intéressante pour mieux définir les paramètres électriques à mesurer. Elle oriente le choix rationnel des ingrédients dans le but de maximiser le signal du couple milieu-microorganisme. Ainsi la réduction en anaérobiose de l'oxyde triméthylamine (TMAO) en triméthylamine (TMA) en présence de donneurs d'électrons, permet de détecter plusieurs bactéries Gram négatif (Easter et coll., 1982). Selon la théorie de Owens (1985), la détection d'un microorganisme homofermentaire est caractérisée par l'augmentation de la conductance résultant de la somme de la conductivité molaire des ions, phosphate, lactate et ammonium quaternaire. Avec d'autres auteurs (Owens et coll., 1985, 1986), il décrivait plus tard que les modifications du couple acide base des tampons étaient la source principale de la variation de conductance des milieux. Par contre la conversion du CO<sub>2</sub> bactérien en ion carbonate d'hydrogène (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) par l'ion hydroxyle OH<sup>-</sup> (KOH) est à la base même de la technique de l'impédancemétrie indirecte pour la recherche des microorganismes producteurs de CO<sub>2</sub> (Owens et coll., 1989).

Dans le cas de *Listeria*, aucune étude n'a encore été entreprise pour expliquer la source de variation de la capacitance. Pine et coll. (1988) ont montré que dans les conditions d'anaérobiose, seul l'acide lactique était formé. En aérobiose l'acide lactique et/ou acétique avec de faibles quantités d'acides isobutyrique et isovalérique étaient détectés. Ils affirmaient que les acides iso mais aussi l'acide acétique dérivait du métabolisme oxydatif des amino-acides leucine et iso-leucine. Ces deux composés figurent parmi les 18 amino-acides libres de la pastose (Maury, 1987) incorporée dans notre milieu. Miller et Silverman (1959) ont rapporté que 91% des produits de l'oxydation aérobie du glucose par *L. monocytogenes* étaient constitués par le lactate, l'acétoïne et le pyruvate. Comme Pine et coll. (1988), nous n'avons pas rencontré ce dernier acide dans notre étude.

Le maltose présent à toutes les étapes de détection est le produit intermédiaire de l'hydrolyse de l'amidon par une  $\alpha$ -D-glucopyranosidase. Le glucose proviendrait de l'hydrolyse enzymatique de l'esculine et le glycérol de la réduction par une  $\alpha$ -glycérophosphate déshydrogénase, de la dihydroxyacétone phosphate formée au cours de la glycolyse. Par contre le bilan des acides organiques déterminés révèle que l'origine de la variation de capacitance est aussi bien fermentative qu'oxydative. Afin de contrôler ces phénomènes, il est opportun d'orienter le métabolisme de *Listeria* sur une seule voie métabolique notamment fermentative soit en réduisant la surface de contact air/volume du milieu à l'intérieur des cupules, de moins de 0,1 (principe de Yvan Hall) soit en utilisant des corps réducteurs. Il faut néanmoins signaler que notre étude est incomplète car nous n'avons recherché ni l'acétoïne ni l'azote ammoniacal qui est important dans la variation de l'impédance des milieux (Lawrence et Moores, 1972; Evans, 1985).

#### IV-2 3 SIGNAL DE *LISTERIA* EN CONDUCTANCE DIRECTE ET INDIRECTE

Nos résultats sont en accord avec les observations de Firstenberg et Zindulis (1984) selon laquelle, lorsque la conductivité initiale du milieu de détection est faible (exemple du PCA), il est recommandé de mesurer la conductance. Dans le cas contraire (exemple du TSB) c'est la capacitance qui est préférable. Par conséquent les milieux empiriques très riches en substrats carbonés et azotés conviennent mieux à la mesure de la capacitance que de la conductance. La conductance initiale du milieu Pasteur, 2 fois supérieure à celle du milieu AES, est trop élevée pour permettre la détection des faibles changements électriques du milieu suite au métabolisme de *Listeria*. Il n'est pas approprié pour la mesure de la conductance directe. En conductancemétrie indirecte, les résultats ne sont pas non plus satisfaisants. Ils sont dus d'une part à l'incompatibilité du milieu et d'autre part au fait que *Listeria* produit peu de dioxyde de carbone au cours de son métabolisme. Ainsi les courbes de *L. monocytogenes* observées par Bolton (1990) étaient peu discriminantes comparées à celles obtenues avec *Staphylococcus aureus* et *Salmonella typhimurium*.

Le milieu AES qui possède une faible conductivité initiale, est adapté à la conductance directe. Les courbes de *Listeria* sont assez caractéristiques. Mais des essais complémentaires sont nécessaires afin de valider les performances de ce milieu.

#### IV-2 4 EFFETS DE L'OXYRASE

La connaissance de l'effet de l'oxygène sur la croissance de *Listeria* est très confuse à ce jour. Alors que l'effet stimulateur de l'oxygène est démontré (George et Lund, 1992), des travaux ont souligné que sa présence n'avait aucun effet significatif sur les cinétiques de croissance de *L. monocytogenes* (Duffy et coll., 1994). Une série de travaux effectués par Buchanan et coll. (1989), Buchanan et Klawitter (1990), Buchanan et Phillips (1990), montraient qu'en général dans les conditions d'anaérobiose, les temps de latence étaient réduits alors que les temps de génération augmentaient. Ces divergences sont dues à la variabilité des méthodes et des matériels utilisés, rendant ainsi difficile toute comparaison.

Les enzymes pour éliminer l'oxygène dissous dans les milieux biologiques ont été pour la première fois décrites par Alder et Crow (1981). Le phénomène est dû à la réduction de l'oxygène en eau en présence de donneurs d'hydrogène grâce à un système enzymatique cytochromique associé au transport séquentiel des électrons dans la chaîne respiratoire. Il en résulte une baisse du potentiel d'oxydo-réduction du milieu nutritif d'environ 20-300 mV. Ces conditions sont importantes pour le recouvrement des cellules bactériennes altérées anaérobies facultatives telles que *Listeria* (Dubos, 1929). La création d'anaérobiose contribue à baisser les délais de réponse de *L. monocytogenes*.

Mais selon Knabel et coll. (1990), les conditions d'anaérobiose stricte sont plus favorables à la recherche des cellules altérées de *Listeria*. Celles-ci peuvent être créées par l'oxyrase. Comme Coppola et Firstenberg (1988), nous observons que l'oxyrase améliore la qualité des courbes et réduit les délais de détection en impédancemétrie. Les temps de latence et de génération sont raccourcis en accord avec Yu et Fung (1991a). A cause de sa spécificité, cette enzyme est plus active pour la réduction de l'oxygène comparée aux réducteurs classiques comme le thioglycolate de sodium, la L-cystéine, le citrate de tetanium III (Yu et Fung (1991b)). Elle permet de stimuler la croissance et de dénombrer des cellules de *Listeria* en très faible nombre dans des produits alimentaires (Yu et Fung (1993)). Mais le coût et les difficultés liées à l'acquisition du produit ne nous permettent pas pour l'instant son usage dans la technique impédancemétrie en contrôle de routine.

#### IV-2 5 SEUIL DE DETECTION DE *LISTERIA*

Le nombre de bactéries atteint dans les cupules au moment de la détection varie dans des proportions assez larges. Nous trouvons des seuils de détection importants compris entre  $10^7$  et  $10^8$  cellules/ml. Ces valeurs sont comparables à celles reportées dans la littérature et qui sont le plus souvent comprises entre  $10^6$  à  $10^8$  cellules/ml (Cady, 1973; Hadley et Senyk, 1975; Firstenberg et Eden, 1984; Suhren et Heeschen, 1985, 1987). Les divergences sont dues à la nature des milieux, des températures d'incubation et surtout au type de microorganisme étudié. Ainsi Schaertel et coll. (1987) ont rapporté que des populations de levures de  $10^4$ - $10^5$  cellules/ml étaient suffisantes pour produire des changements détectables en impédancemétrie à 28°C alors que ce taux était de  $10^8$  cellules/ml dans le cas de *Y. enterocolitica* 0:3 (Borch et Wallentin, 1993).

Ces valeurs de seuil très élevées pour la technique impédancemétrique apparaissent également pour la plupart des méthodes dites "rapides" et constituent une limite à leur application. Ainsi en ATPmétrie par exemple, la présence de l'ATP somatique résiduel peut, en donnant un bruit de fond élevé, augmenter le seuil de détection de l'ordre de  $10^5$  à  $10^6$  cellules/ml (Bossuyt, 1981; Theron et coll., 1986a, 1986b) et même à  $10^7$  cellules/g de viande. (Kennedy et Oblinger, 1985). Dans le cas de l'Ampérométrie, des tests ELISA et de la PCR, ceux-ci varient entre  $10^5$ - $10^6$  (Patchett et coll., 1989; Norrung et coll., 1991; Rossen et coll., 1991). Pour pallier à ces difficultés, des méthodes d'enrichissement sélectif et de concentration par filtration sont préconisées. Si ces méthodes contribuent à baisser effectivement les seuils de détection (Littel et coll., 1986), malheureusement elles alourdissent les protocoles. Seule l'amélioration de la sensibilité de détection des instruments de mesure permettra à l'avenir de rendre plus performantes les méthodes "rapides" de détection.

Cette étude permet également de démontrer une bonne relation de proportionnalité entre le TD et le logarithme du nombre initial de bactéries, en accord avec la littérature (Bülte et Reuter, 1984; Gibson et coll., 1984; Ogden, 1986; Cousins et Marlatt, 1990; Martin et Hearnberger, 1993).

Enfin, nous avons retenu le milieu FRASER AU 1/2 pour l'enrichissement des échantillons à analyser en impédancemétrie. Ce choix est motivé par nos résultats obtenus sur les milieux LEB, UVMI et FRASER AU 1/2 au cours de la détermination des temps de génération de *L. monocytogenes* 4b 19115, du calcul des délais d'enrichissement des échantillons, du seuil de détection et surtout par les données bibliographiques. En effet, plusieurs auteurs (Lammerding et Doyle, 1989; Leasor et

Foegeding, 1989; Bailey et coll., 1990; Warburton et coll., 1991; Hayes et coll., 1992; Ferron et Michard, 1993) ont rapporté que l'UVMI était plus performant que le LEB pour la recherche de *Listeria*. Le milieu LEB étant non tamponné, la fermentation du glucose présent conduit à une baisse du pH jusqu'à des seuils défavorables à la multiplication de *Listeria*. Plus la durée d'enrichissement est prolongée plus cette modification est accentuée. On peut observer jusqu'à la perte de deux unités pH. Or les variations de pH sont déterminantes lors des enrichissements sélectifs (Ryser et Marth, 1991; Cox et coll., 1988).

Le milieu UVMI ne contient pas de glucose. La présence de tampon phosphate minimise la baisse du pH et la croissance de *Listeria* n'est pas affectée. Par contre Ravomanana et coll. (1993) ont montré que le milieu FRASER était plus intéressant que les milieux LEB et UVMI pour la recherche de *Listeria* dans différentes catégories d'échantillons alimentaires. Les milieux UVMI et FRASER AU 1/2 possèdent la même formule au niveau de la base à la différence que dans le dernier, on trouve du citrate de fer ammoniacal et du chlorure de lithium. Nous avons montré que le chlorure de lithium est néfaste sur le signal impédancemétrique. Mais sa présence améliore la sélectivité des bouillons d'enrichissement. Nous avons donc retenu le FRASER AU 1/2 dans le protocole impédancemétrique.

## IV-3 VALIDATION DE LA METHODE IMPEDANCEMETRIQUE

### IV-3 1 LA METHODE AFNOR V08 055

Tous les prélèvements ont été neutralisés avant l'analyse, par une solution neutralisante. Il a été prouvé qu'une telle solution est non toxique pour *Listeria* et permet d'inactiver effectivement les effets listéricides des désinfectants chlorés, iodophores et ammoniums quaternaires éventuellement présents lors de l'échantillonnage (Tuncan, 1993).

Cette étude, nous a montré que la présence de *Listeria* est fréquente dans l'environnement des industries agro-alimentaires malgré l'application de différents procédés et plans de nettoyage typiques à chaque industrie. Parmi les espèces rencontrées *L. monocytogenes* et *L. innocua* sont les plus nombreuses. Il faut cependant relativiser ces résultats car l'identification a été effectuée sur un faible nombre de colonies. Par ailleurs il est possible que les méthodes actuellement utilisées pour la recherche de *Listeria* soient plus favorables à l'isolement de *L. innocua* que *L. monocytogenes*. Beumer et coll. (1988) ont montré que les milieux contenant de

l'acriflavine peuvent inhiber la culture de cellules de *L. monocytogenes* stressées mais également celles qui n'ont pas subies de traitement stressant. Dans ces conditions, on peut observer soit la mort de ces cellules déjà en très faible nombre dans le milieu, soit un rallongement de leur temps de génération avec des conséquences importantes sur leur mise en évidence. Selon le document de la DGCCRF (Anonyme, 1992a), il est noté en cas de présence simultanée de *L. monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria*, que la mise en évidence de *L. monocytogenes* est d'autant plus aléatoire que sa proportion dans le mélange d'espèces est faible. Sur les 50 échantillons positifs rencontrés, nous avons pu isolé *L. monocytogenes* associée soit à *L. innocua* soit à *L. seeligeri* dans seulement deux. Les autres présentent une seule espèce à la fois.

Macdonald et Sutherland (1994) ont montré que lorsqu'on met en culture une même population initiale de *L. monocytogenes* et de *L. innocua* dans du LEB, seule cette dernière espèce est isolée sur la gélose Oxford après 48 heures d'enrichissement. Petran et Swanson. (1993) généralisaient ce résultat à tous les milieux traditionnellement utilisés pour la recherche de *Listeria*. Ils ont rapporté que la croissance de *L. monocytogenes* était inhibée dans le milieu UVMI (dont la formule est proche de celle du FRASER AU 1/2) comparée à *L. innocua*. Ceci pourrait s'expliquer par la croissance rapide de *L. innocua* qui envahirait *L. monocytogenes* et rendrait peu probable son isolement (Duh et Schaffner, 1993; Curiale et Lewus, 1994). Ainsi son identification effectuée à partir d'un nombre défini de colonies choisi au hasard sur les boîtes de Petri peut être faussée.

Poyski et coll. (1993) ont proposé un milieu sélectif permettant de différencier ces deux espèces. Mais dans le cas des contaminations d'environnement, il n'est pas obligatoire de rechercher seulement *L. monocytogenes*. La détection des autres espèces notamment *L. innocua* est importante et peut constituer une suspicion de présence de *L. monocytogenes*. Aussi toute présence de *Listeria* sur une surface ou un matériel de travail au cours du process atteste d'une mauvaise hygiène dans les conditions de travail. Comme Cox et coll. (1989), nous constatons que les milieux humides contenant des particules organiques visibles sont favorables à la prolifération des *Listeria*.

Des travaux en impédancemétrie ont montré que certains désinfectants sont neutralisés par la présence de matière organique (Cordier et coll., 1989). Dans ces conditions, *Listeria* est très difficile à éliminer car la désinfection n'est efficace que lorsqu'elle a lieu sur des surfaces débarassées de toutes souillures. Ces souillures sont responsables de la formation de biofilms qui abritent les *Listeria* et constituent des barrières physiques contre les produits de désinfection (Dychdala, 1983; Frank et Koffi, 1990; Anonyme, 1992b). Les microorganismes peuvent survivre voire se multiplier à

l'intérieur de ces biofilms, puis être rejetés par la suite accidentellement dans l'environnement (Mosteller et coll., 1994). Des travaux ont souligné le manque d'efficacité des désinfectants vis à vis de *Listeria* lorsque celle-ci est fixée sur de la chitine ou sur des supports en acier et en bois (Dhaliwal et coll., 1992; McCarthy, 1992). Ainsi deux paramètres contribuent à la survie puis à la colonisation des surfaces par *Listeria*: l'adhérence favorisée par les supports hydrophobes (Mafu et coll., 1991) et la prolifération. Les conséquences liées à la présence des biofilms en industries alimentaires sont discutées par Dubois et Leveau (1994).

Kleiss et coll. (Communication personnelle) lors de la recherche de *Listeria* dans l'environnement d'une scierie ont remarqué une prédominance de *L. ivanovii* (46%). Ceci s'explique par le fait que le xylose (abondant dans le bois), offre de bonnes conditions de colonisation des boues par *L. ivanovii*. Ainsi l'environnement joue lui-même un rôle important dans la sélection et la colonisation par une espèce donnée de *Listeria*. Les échantillons provenant de l'usine A sont contaminés à 46% par *Listeria*. Ils sont prélevés en deux campagnes pendant que l'usine était en pleine activité. *L. monocytogenes* est isolée à plusieurs reprises dans des endroits variés. L'environnement de cette usine semble être colonisé par *Listeria* et une étude plus discriminante (ribotypie, profils des isoenzymes, CPG...) sur les souches isolées sera nécessaire pour identifier l'origine des contaminations.

Sa forte présence (2/3 des échantillons positifs) sur le sol est inquiétante car elle peut être disséminée à travers l'usine par la circulation du personnel et des chariots. Dans ces conditions seules une désinfection efficace et la sectorisation permettront de réduire la contamination de l'ensemble du site par *Listeria*. Nous avons isolé *L. monocytogenes* et *L. innocua* respectivement sur une machine et dans un bac de récupération qui constituent ainsi une source de contamination évidente des produits finis.

Les échantillons provenant de l'usine B sont prélevés 48 heures après le nettoyage et la désinfection des ateliers de fabrication, avant la reprise de l'activité. Ils ne contiennent pas de *Listeria*. Le plan d'hygiène utilisé dans cette usine semble donc être efficace pour assurer des conditions de travail sécurisantes.

*L. innocua* présente sur une roue de benne de décharge ainsi que sur un balai de coco à partir des échantillons de l'usine C, pourrait être facilement disséminée à travers les ateliers de fabrication. Une désinfection efficace des voies de passage sera utile pour réduire les possibilités de récontamination.

La présence de *L. monocytogenes* dans les locaux de production de l'usine D est fort problématique car à ce stade, les produits fabriqués ne subissent aucun traitement assainissant au moment de leur consommation. Le même constat s'impose pour les échantillons récoltés dans le supermarché. *L. monocytogenes* présente sur le matériel de travail (planches à découpe, balances, couteaux...), peut recontaminer facilement plusieurs produits. Il est souhaitable de nettoyer et de désinfecter fréquemment ce type de matériel afin de réduire les risques de recontamination.

Les prélèvements de l'usine E avant reprise de l'activité contiennent *L. monocytogenes*. Après le nettoyage et la désinfection des ateliers, aucun échantillon analysé ne renferme cette espèce. Le nombre des échantillons positifs est passé de 6 à 2 mais *L. innocua* est toujours présente. Dans les conditions normales de nettoyage, *Listeria* ne résiste pas aux désinfectants aldéhydes, chlorés, iodés et aux ammoniums quaternaires (Gottardi, 1983). L'établissement de plans de nettoyage et de désinfection efficaces dans les ateliers, leur surveillance et la vérification de leur application constituent sans doute une démarche souhaitable pour travailler dans des conditions de sécurité acceptable.

#### **IV-3 2 COMPARAISON DES METHODES AFNOR V08 055 ET IMPEDANCEMETRIE**

Aucune des deux méthodes n'est pleinement satisfaisante pour la recherche de *Listeria*. Parmi les échantillons positifs, 47/50 sont détectés par impédancemétrie en 48 heures dont cinq ne présentent pas de courbes typiques de *Listeria*. Pour ceux-ci, la lecture de la coloration noire des cupules correspondantes a permis d'avoir des résultats présomptifs. Un isolement sur la gélose Palcam est prudent dans ces conditions. Mais cette gélose étant très sélective, elle peut réprimer des cellules bactériennes ayant subi au préalable des traitements stressants. Il est alors souhaitable de faire les confirmations également sur la gélose Oxford qui est moins sélective, mais moins inhibitrice (Curtis et coll., 1989; Gunasinghe et coll., 1994).

Aucun faux positif n'est observé. Ce qui est remarquable dans notre technique car l'un des problèmes majeurs rencontrés dans les méthodes dites "rapides" est la présence fréquente des faux positifs. Ainsi Bolton et Powell (1990) ont noté lors de la recherche de *Listeria* dans l'environnement industriel, que la méthode Malthus donnait 16% de faux positifs.

Les courbes sont stables et reproductibles. La méthode mise au point semble spécifique des *Listeria*. Comme pour la méthode de référence, une phase d'enrichissement sélectif est nécessaire afin d'obtenir des bouillons riches en *Listeria* c'est à dire de l'ordre de  $10^7$  cellules /ml qui est le seuil de détection de l'appareil. Cette étape est déterminante pour la réussite de la méthode.

Yu et Fung (1992) préconisaient l'utilisation de l'oxyrase dans le FRASER pour améliorer la sensibilité de détection de *Listeria*. Nous avons démontré que cette enzyme contribue réellement à baisser les TD. D'autres auteurs se sont orientés vers l'utilisation de la technique de séparation préalable des cultures de *Listeria* par immunocapture sur billes magnétiques (Skjerve et Olsvik, 1990; Mitchell et coll., 1994). Elle est utilisée avec succès aux USA et au Canada pour la détection de *E. coli* séro groupe O 157. Elle a l'avantage de sélectionner spécifiquement la bactérie cible et de réduire l'effet compétitif des microorganismes non inhibés. La phase de détection se trouvant ainsi facilitée, elle pourrait même être envisagée en milieu non sélectif c'est à dire sans antibiotiques.

Les deux méthodes ont la même spécificité mais la sensibilité de la méthode AFNOR V08 055 semble plus élevée que celle de l'impédancemétrie à cause de la présence de 4% de faux négatifs. Cependant la différence entre les proportions des échantillons positifs par les deux méthodes est statistiquement non significative au seuil de probabilité  $\alpha=5\%$ . L'impédancemétrie peut donc servir d'alternative à la méthode officielle AFNOR V08 055 avec des performances semblables, pour la détection des échantillons positifs. Mais c'est une méthode de screening et elle nécessite une confirmation des échantillons suspects par isolement sur la gélose Palcam (et/ou Oxford) puis identification par les tests biochimiques sur la galerie Api<sup>®</sup> Listeria.

Elle semble constituer un outil pouvant servir à assurer les plans d'hygiène établis dans les usines pour maîtriser les contaminations de l'environnement par *Listeria*. La réponse en 48 heures permettrait d'intervenir rapidement dans les zones à risques pour éviter de contaminer les produits finis. Un système documentaire peut être créé par l'enregistrement et l'archivage des données sur disquette. Ces documents pourraient servir de preuves dans des situations contractuelles ou réglementaires. Cette méthode répond assez bien à la démarche HACCP. La technique est simple, facile et peut servir en routine pour l'analyse d'échantillons à grande échelle.

#### IV-4 CARACTERISATION DE *LISTERIA* PAR LA CPG

La CPG est une technique de séparation qui a été utilisée pour la première fois en bactériologie dans les années 1960. Les travaux de plusieurs auteurs (Ikemoto et coll., 1978; Stead, 1992; Yang et coll., 1993; Huys et coll., 1994) ont montré qu'il était possible de différencier des microorganismes sur la base de la composition en acides de leur membrane externe. Ainsi des espèces parfois très proches selon des critères physiologiques et/ou biochimiques ont pu être séparées grâce à l'analyse quantitative et qualitative de leur contenu en acides gras.

Nos résultats montrent que l'analyse qualitative et quantitative des profils d'acides gras obtenus en CPG est difficilement utilisable pour faire de l'identification des espèces du genre *Listeria*. On observe d'importantes variations dans la composition en acides gras à l'intérieure d'une même espèce; ce qui pourrait être liée à l'existence d'entités génétiquement différentes. A partir des identifications résultant de la banque de données TSBA, on observe que tous les chromatogrammes sont équivalents à ceux de *L. monocytogenes* et quelques fois à ceux de *B. coagulans* quelque soit l'espèce ou la souche testée. Ces résultats confirment que *Listeria* est taxonomiquement proche du genre *Bacillus*. Des auteurs ont également rapporté des similarités entre les profils d'acides gras de *L. monocytogenes* et de certains *Propionibacterium* (Moss et coll., 1967; Moss et Cherry, 1968). Dans le cas d'un usage en routine, il est indispensable d'associer en parallèle à la CPG, une recherche de l'hémolyse par l'étude du camp-test et la non fermentation du xylose afin de différencier *L. monocytogenes* des autres espèces. Mais il faudrait faire attention aux souches ayant perdu spontanément leur caractère hémolytique.

Comme Al-Issa et coll. (1984) et plus récemment Püttmann et coll. (1993) nous avons remarqué que les acides gras ramifiés (Anteiso puis Iso) 15:0 et 17:0 sont les plus nombreux et ce modèle varie peu quelle que soit l'espèce. A la différence de Raines et coll. (1968) mais en accord avec Hether et coll. (1983) et von Graevenitz et coll. (1991), nos résultats montrent que les chaînes carbonées 12:0,14:0 et 16:1 sont présents en trace c'est à dire moins de 1%. L'origine des souches et les conditions de détection pourraient être responsables de ces divergences. Julak et coll. (1989) ont rapporté des quantités de 20% en 14:0 chez *L. monocytogenes* qui ont été ni confirmées par Bernard et coll. (1991) ni par notre étude.

La présence des acides gras ramifiés 15:0 et 17:0 révèle une importance majeure chez *L. monocytogenes*. Selon les travaux de Juneja et Davidson (1993), leur concentration respective varierait en relation inverse avec l'élévation de la température et permettrait à la bactérie d'augmenter sa fluidité membranaire. Cette propriété pourrait expliquer les facultés étonnantes de *Listeria* à s'adapter dans des conditions difficiles. Kaneta (1991) a également souligné le rôle joué par ces deux types d'acides gras dans les régulations physiologiques.

En accord avec Ninet et coll. (1992) nous avons observé une relation proportionnellement croissante entre le logarithme des rapports 17:0 Anteiso/17:0 Iso et 15:0 Anteiso/15:0 Iso. L'utilisation des valeurs logarithmiques se justifie par le fait que les ratios montrent une relation directe entre le degré de dispersion et leur amplitude. Par cette analyse quantitative des ratios ces auteurs ont réussi à former des clusters distincts formés par *L. grayi* et *L. murrayi*. Mais *L. monocytogenes* et *L. innocua* restaient liés comme l'ont montré nos résultats. Ce paramètre quantitatif caractériserait mieux *Listeria* par comparaison aux profils bruts (analyse qualitative).

Dans le cadre d'une démarche HACCP, il peut être nécessaire de déterminer rapidement l'origine d'une souche bactérienne dans une unité de production. Par l'analyse multivariante des clusters, la CPG est capable de donner rapidement les réponses. Les résultats montrent que la variabilité au niveau des souches est structurée en groupes. Les échantillons de l'Usine A sont assez bien regroupés mais des recoupements surviennent souvent avec des échantillons de l'Usine F. Ceux-ci pourraient être dus à des similarités effectives (sérotypes, lysotypes,..) entre ces souches de différentes origines. La présence de clusters caractéristiques à l'Usine A suppose la colonisation de cette unité par *Listeria* alors que dans le cas de l'Usine F, il s'agirait d'une simple contamination évitable à travers des opérations efficaces de nettoyage et de désinfection.

Par la classification hiérarchisée des clusters, Petersen et Klug (1994) ont pu suivre dans le temps et en fonction de la température les principales modifications des profils d'acides gras. Mais en accord avec nos observations, il y avait des recoupements lorsque peu de différence existait entre les échantillons. Eerola et Lehtonen (1988) ont rapporté que le meilleur emploi des clusters passait par la sélection préalable de la méthode d'hiérarchisation la mieux adaptée. Ainsi par exemple, la présence d'acides gras en trace augmente les écarts et conduit à des regroupements erronés. En comparant dix méthodes de regroupement des microorganismes répertoriées dans la littérature, ces auteurs ont trouvé que seulement deux donnaient des résultats acceptables.

Mais comme eux, nous pensons que la création de sa propre banque de données à partir de souches identifiées et référencées, est sans doute une bonne approche pour une utilisation optimale de la CPG. C'est donc une étude préliminaire qui mérite d'être affinée.

#### IV-5 LES INDICATEURS DE *LISTERIA*

Le but de la recherche des indicateurs est une approche indirecte permettant d'éviter l'utilisation de méthodologies lourdes pour la recherche de germes spécifiques. Frank et coll. (1990) ont indiqué que l'appréciation de l'efficacité des désinfections peut être obtenue par la recherche des indicateurs. Comme ces auteurs, nous avons remarqué que le risque de la présence de *Listeria* est associée à de fortes populations de plusieurs groupes de microorganismes. Il faut noter que *Listeria* a été isolée dans des échantillons apparemment propres contenant moins de 2 cfu/cm<sup>2</sup>. Schaertel et coll. (1987) puis Premaratne et coll. (1991) expliquaient que de tels résultats sont dus à la faculté pour *Listeria* de tirer son énergie à partir de certains sucres notamment la N-acétylglucosamine présente dans la composition membranaire des bactéries, des levures et dans l'exosquelette des insectes. Ainsi, grâce à la présence d'autres microorganismes, *Listeria* pourrait survivre et même coloniser des micro-environnements apparemment défavorables à sa multiplication. Une autre explication serait la possibilité de contamination croisée car les mêmes convoyeurs circulent entre les salles de stockage des matières premières (zones sales) et les ateliers de fabrication (zones propres).

A partir de 10<sup>3</sup> cfu/cm<sup>2</sup>, le risque de la présence de *Listeria* devient important et une corrélation est établie avec la numération des germes aérobies mésophiles et des levures. Le risque 100% observé dans le cas des moisissures dans les intervalles 10<sup>2</sup>-10<sup>3</sup> et 10<sup>4</sup>-6.10<sup>5</sup> cfu/cm<sup>2</sup> a été obtenu avec respectivement 1 et 2 échantillons et a peut être peu de signification. Frank et coll. (1990) ont indiqué une valeur seuil de 6,600 staphylocoques/écouvillon comme indicative de la présence probable de *Listeria*.

L'ensemble des renseignements obtenus dans cette étude est important et pourrait être exploité lors d'une démarche d'assurance qualité pour fixer des barrières d'efficacité de nettoyage afin de minimiser le risque *Listeria*. Dans ces conditions, l'application des méthodes rapides non spécifiques (Impédancemétrie, ATPmétrie, Cytométrie de flux, DEFT...) serait utile pour donner rapidement les informations nécessaires.

Le dénombrement des coliformes totaux à 30°C ne donne pas de résultats cohérents. Ils pourraient cependant être considérés comme des indicateurs technologiques car ce sont des bactéries très sensibles aux traitements sanitaires ici les désinfections. En plus de ces groupes de microorganismes, Gabis et Fauss (1988) ont préconisé le dénombrement des Enterobacteriaceae comme indicateur de *Listeria* alors que Ferron et Michard (1993) ont observé que la fréquence des isolements de *Listeria* augmentait avec le nombre des germes aérobies mésophiles. Mais du point de vue taxonomique, écologique et physiologique, Cordier et coll. (1989) préféraient les *Streptococcus* du groupe D de Lancefield. Nous pensons que dans le cas de *L. monocytogenes*, l'indicateur le plus significatif serait *L. innocua*.

Mossel (1967) a indiqué que la désignation et l'interprétation des indicateurs sont délicates. Alors que Miskimin et coll. (1976) mentionnaient qu'aucun indicateur n'est convenable comme test pour assurer la sécurité alimentaire. Ces incertitudes au niveau des positions sur les indicateurs montrent qu'il n'existe pas une solution absolue. C'est pourquoi chaque fois qu'il est possible, il faudrait privilégier les méthodes de recherche directe. Nous pensons que la technique de l'impédancemétrie que nous avons décrite peut être très utile pour détecter *Listeria* dans les ateliers de production.

## CONCLUSION & PERSPECTIVES

## V CONCLUSION & PERSPECTIVES

L'épidémie de listériose qui sévit en ce moment sur le territoire français dû à la consommation du fromage (Brie de Meaux), nous rappelle et justifie une fois de plus qu'il est capital de mettre au point des techniques rapides et fiables permettant l'analyse des produits alimentaires mais également l'environnement de leur process afin de fournir aux consommateurs des aliments sans danger microbiologique.

Nous avons sélectionné, puis modifié le milieu OXFORD parmi 6 autres traditionnellement utilisés pour la recherche de *Listeria*. L'application d'un plan d'expériences a permis de formuler et d'optimiser un supplément sélectif pour inhiber la flore associée indésirable. Le pH optimal de ce milieu se situe entre 6,5 et 7. En général le signal de *Listeria* est typique. Seules *L. ivanovii*, *L. seeligeri* et *L. grayi* sont difficiles à détecter car ces bactéries sont sensibles aux antibiotiques utilisés dans le milieu. Les délais de détection peuvent être réduits en présence d'oxyrase. Ce milieu possède une conductivité élevée et ne convient pas à la détection de *Listeria* en conductance directe. De même, *Listeria* étant peu (ou pas) gazogène, son analyse en conductance indirecte à partir de ce milieu donne des courbes atypiques.

En calculant le temps de génération de *Listeria*, il est possible de prévoir sur la base du seuil de détection de la méthode, les délais d'enrichissement des échantillons à examiner. L'emploi d'un diluant pour neutraliser les substances inhibitrices a permis d'adapter la méthode impédancemétrique à l'analyse des prélèvements provenant de l'environnement industriel. Les résultats obtenus sont identiques à ceux de la méthode de référence AFNOR V08 055 au seuil de probabilité  $\alpha = 5\%$ . La méthode de l'impédancemétrie est rapide car 94% des échantillons positifs sont détectés en 48 heures. Ce temps inclus la durée d'enrichissement et de détection. Les échantillons négatifs sont rapidement libérés.

La méthode proposée est facile à mettre en oeuvre et plus économique que les méthodes traditionnelles. Elle pourrait servir d'alternative à la méthode AFNOR V08 055. La pertinence des résultats obtenus semble en sa faveur pour servir à l'établissement des systèmes de surveillance permettant de s'assurer de la maîtrise effective des plans d'hygiène dans les usines. Elle s'inscrit ainsi dans la démarche HACCP recommandée par l'OMS, l'ICMSF, le Codex Alimentarius et reprise par la CEE à travers la directive 93/43/CEE. Cette directive impose aux entreprises du secteur alimentaire, d'identifier tout aspect de leurs activités qui est déterminant pour la sécurité des aliments.

Les textes expliquent que les procédures de sécurité appropriées doivent être établies selon les principes du HACCP qui prévoit dans sa démarche, un système de surveillance par auto-contrôle. Ces auto-contrôles doivent fournir l'information en temps utile pour qu'une action corrective puisse être mise en place. Dans ce contexte, nous remarquons que les méthodes traditionnelles sont inappropriées. Par contre la méthode impédancemétrique que nous avons développée répond assez bien à ce besoin de rapidité de réponse. Elle devrait se révéler fort utile aux industriels dans la mise en place de mesures de préventions afin de maîtriser le danger *Listeria* dans l'environnement des aliments. Des mesures correctives efficaces peuvent ainsi être rapidement mises en place lorsque des écarts sont observés au niveau des CCP.

L'étude quantitative par la CPG des profils d'acides gras ramifiés C17 et C15 des souches identifiées à partir de l'environnement ainsi que la classification hiérarchisée de tous les profils à travers les programmes Dendogram et 2D-Plot pourraient être intéressantes pour établir une relation entre les souches examinées et l'origine de contamination. C'est une voie d'approche en vue de la maîtrise de la contamination par *Listeria*. Mais l'identification des espèces du genre *Listeria* en routine par la CPG est difficilement envisageable.

A l'exception de *L. innocua* aucun autre microorganisme n'est pleinement satisfaisant comme indicateur de la présence éventuelle de *Listeria*. C'est pourquoi il est indispensable dans tous les cas, de privilégier les méthodes directes de sa mise en évidence.

Le travail présenté est original dans sa démarche. Il a conduit à mettre au point une méthode rapide susceptible de répondre aux besoins des industriels agro-alimentaires. Mais sa validation officielle s'impose si nous voulons la rendre plus crédible et la faire accepter par la communauté scientifique. D'autres méthodes automatisables telles que les méthodes d'identification par les sondes nucléiques, associées à l'impédancemétrie pour l'identification exclusive de *L. monocytogenes* pourraient rendre plus séduisante cette technique auprès des opérateurs de l'agro-alimentaire.

**REFERENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, M. R., Bryan, J. J. and Thurston, P. J. 1989. A medium designed for monitoring pitching yeast contamination in beer using a conductimetric technique. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 55-58.

Adams, T. J., Vartivarian, S. and Cowart, R. E. 1990. Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Imm.*, 8: 2715-2718.

Alder, H. L. and Crow, W. D. 1981. A novel approach to the growth of anaerobic microorganisms. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, John Wiley and sons, 11: 533-540.

Al-Issa, M., Fowler, D. R., Seaman, A. and Woodbine, M. 1984. Role of lipid in butylatedhydroxyanisole (BHA) resistance of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Hyg. A.*, 258: 42.

Allison, J. B. Anderson, J. A. and Cole, W. H. 1938. The method of electrical conductivity in studies of bacterial metabolism. *J. Bacteriol.*, 36: 571-586.  $\alpha$

Anonyme. 1988. US Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual, Chap. 29-*Listeria* isolation; revised method of analysis: notice. *Fed. Regist.*, 53: 44147-44153.

Anonyme. 1992a. Direction Générale de Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes. *Listeria monocytogenes* et aliments. Lettre d'Information, DGCCRF. Paris, 32 pages.

Anonyme. 1992b. Fédération Française des Industries Charcutières. *Listeria* dans les produits de charcuterie. Mesures préventives. FIC, Paris; 36 pages.

Anonyme 1993. Contrôle de la qualité des produits alimentaires. Contrôle microbiologique. Recueil de normes françaises. AFNOR-DGCCRF 5<sup>e</sup> éd., 1-813.

Audurier, A., and Martin, C. 1989. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Intern. J. Food Microbiol.*, 8: 251-257.

Baernstein, H. D. 1928. The conductivity method and proteolysis. An interpretation of the conductivity changes. J. Biol. Chem., L 28, 2, 7: 481-493.

Bailey, J. S., Fletcher, D. L. and Cox, N. A. 1990. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 53, 6:473-477.

Baird-Parker, A. C. 1962. An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. J. Appl. Bacteriol., 25:12-19.

Baumgard, J., Sieker, S. and Vogelsang, B. 1994. *Listeria monocytogenes* in minced-determination by impedance method and a new selective medium. Fleischwirtschaft, 74, 6: 647-648.

Bernard, K. A., Bellfeuille, M. and Ewan, E. P. 1991. Cellular fatty acid composition as an adjunct to the identification of asporogenous, aerobic Gram-positive rods. J. Clin. Microbiol., 29: 83-89.

Beumer, R. R., van Dijk, D. and De Roode, J.W. 1988. Influence of different tryptaflavine concentrations on the growth of *Listeria* in enrichment broth. Abstracts of the 10th International symposium on Listeriosis, 21-26 august, Pècs Hungary.

Bille, J. 1990. Epidemiology of humain listeriosis in Europe with special reference to the swiss outbreak. In Miller A. J., Smith J. L. and Somkuti G. A. (ed.), Foodborne listeriosis. Elsevier Sciences Publishing Inc., New York, p. 71-74.

Bishop, J. R., White, C. H. and Firstenberg-Eden, R. 1984. Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. J. Food Prot., 47, 6: 471-475.

Bolton, F. J. 1990. An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria. J. Appl. Bacteriol., 69: 655-661.

Bolton, F. J. and Powell, S. J. 1990. Detection of *Listeria* in food and food processing environments. Analysis and Control, 24:43-48.

Borch, E. and Wallentin, C. 1993. Conductance measurements for data generation in prédictive modeling. J. Indust. Microbiol., 12: 286-290.

Bossuyt, R. 1981. Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft*, 36, 5: 257-260.

Bossuyt, R. G. and Waes, G. M. 1983. Impedance measurements to detect post-pasteurization contamination of pasteurized milk. *J. Food Prot.*, 46, 7: 622-624.

Botha, W. C., Lücke, H. and Jooste, P. J. 1986. Determination of bacterial ATP in milk. The influence of adenosine triphosphate-hydrolyzing enzymes from somatic cells and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Prot.*, 49, 10: 822-825.

Bougle, D. L. and Stahl, V. 1994. Survival of *Listeria monocytogenes* after irradiation treatment of camembert cheeses made from raw milk. *J. Food Prot.*, 57, 9: 811-813.

Box, G. E. P., Hunter, W., G. and Hunter, J. S. 1971. *Statistics for experimenters*. John Wiley and sons.

Bradshaw, J. G., Peeler, J. T., Corvin, J. J., Hunt, J. M., Tierney, J. T., Larkin, E. P. and Twedt, R. M. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Prot.*, 48: 743-745.

Briand Y., M. 1986. *Mécanismes moléculaires de l'action des antibiotiques*. Ed. Masson, 6: 227-283.

Brisou, J. 1971. *Techniques d'enzymologie bactérienne*. Ed Masson & cie, pages 1-275.

Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Ed. EIGHTH, 593-596.

Buchanan, R. L. and Klawitter, L. A. 1990. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *J. Food Sci.*, 55: 1754-1756.

Buchanan, R. L. and Phillips, J. G. 1990. Response surface model for predicting the effect of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 5: 370-376.

Buchanan, R. L., Stahl, H. G. and Whiting, R. C. 1989. Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride and sodium nitrite on growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 52: 844-851.

Bullock, R. D. and Frodsham, D. 1989. Rapid impedance detection of Salmonellas in confectionery using modified LICNR broth. J. Appl. Bacteriol., 66: 385-391.

Bülte, M. and Reuter, G. 1984. Impedance measurement as a rapid method for the determination of the microbial contamination of meat surfaces, testing two different instruments. Intern. J. Food Microbiol., 1: 113-125.

Busch, S. V. and Donnelly, C. W. 1992. Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat-injured *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 1: 14-20.

Cady, P. 1973. (1<sup>er</sup> symposium international des méthodes rapides en microbiologie). Rapid automated bacterial identification by impedance measurement. New approaches to the identification of microorganisms.(ed CARL GORAN HEDEN, Tibor Illoli 1975) John Wiley and sons, New York.

Cady, P., Dufour, S. W., Hardy, D., Martins, S. and Kraeger, S. J. 1978a. Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content. J. Food Prot., 41: 277-287.

Cady, P., Dufour, S. W., Lawless, P., Nunke, B. and Kraeger, J. 1978b. Impedimetric screening for bacteriuria. J. Clin. Microbiol., 7: 273-278.

Cady, P., Dufour, S. W., Shaw, J. and Kraeger, S. J. 1978c. Electrical impedance measurements: Rapid method for detecting and monitoring microorganisms. J. Clin. Microbiol., 3: 265-272.

Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M. G. 1989. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 52: 614-617.

Connolly, P., Bloomfield, S. F. and Denyer, S. P. 1994. The use of impedance for preservative efficacy testing of pharmaceuticals and cosmetic products. J. Appl. Bacteriol., 76: 68-74.

Connolly, P., Lewis, S. J. and Corry, J. E. L. 1988. A medium for the detection of yeasts using a conductimetric method. *Int. J. Food Microbiol.*, 7: 31-40.

Coppola, K. and Firstenberg-Eden, R. 1988. Impedance based rapid method for detection of spoilage organisms in UHT low-acid foods. *J. Food Sci.*, 53, 5: 1521-152.

Cordier, J. L., Putallaz, T. and Cox, L. J. 1989. Impedimetric determination of activity of disinfectants and detergents on *Listeria*: Preliminary study. *Intern. J. Food Microbiol.*, 8: 293-297.

Cossard, P. and Mengaud, J. 1989. *Listeria monocytogenes*-a model system for the molecular study of intracellular parasites. *Mol. Biol. Med.*, 6: 463-474.

Donnelly, C. W. and Baigent, G. J. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10: 689-695.

Crisley, F. D., Angelotti, R. and Fotter, M. J. 1964. In multiplication of *Staphylococcus aureus* in synthetic cream fillings and pies. *Publ. Health Report, WA*, 79: 369-376.

Cousins, D. L. and Marlatt, F. 1990. An evaluation of a conductance method for the enumeration of Enterobacteriaceae in milk. *J. Food Prot.*, 53, 7: 568-570.

Cowart, R.E. 1987. Iron regulation of growth and haemolysin production by *Listeria monocytogenes*. *Ann. Inst. Past. Microbiol.*, 138: 246-249.

Cowart, R.E., and Foster, B.G. 1985. Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect. Dis.*, 151: 721-730.

Cox, L. J., Dooley, D. and Beumer, R. 1990. Effect of lithium chloride and other inhibitors on the growth of *Listeria* spp. *Food Microbiol.*, 7: 311-325.

Cox, L. J., Kleiss, T., Cordier, J. L., Cordella, C., Konkell, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. and Siebenga, A. 1989. *Listeria* spp in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiol.*, 6: 49-61.

Cox, L. J., Renaud, A. and Van Schothorst. 1988. Some studies on methodology for recuperation of *Listeria monocytogenes* from food with special reference to soft cheeses. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71: 449 Abstr.

Cox, L. J., Siebenga, A., Pedrazzini, C. and Moreton, J. 1991. Enhanced haemolysis agar (EHA) an improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes*. Food Microbiol., 8: 37-49.

Curiale, M. S. and Lewus, C. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. J. Food Prot., 57, 12: 1048-1051.

Curtis, G. D. W., Mitchell, R. G., King, A. F. and Emma, J. 1989. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol., 8: 95-98.

Dallas, H. L., Tran, T. T., Poindexter, C. E. and Hitchins, A. D. 1991. Competition of food bacteria with *Listeria monocytogenes* during enrichment culture. J. Food Safety, 11: 293-301.

Dallimer, A. W. and Martin, S. E. 1988. Catalase and superoxide dismutase activities after heat-injury of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 54: 581-582.

Deak, T. and Beuchat, L. R. 1993. Evaluation of the indirect conductance method for the detection of yeasts in laboratory media and apple juice. Food Microbiol., 10: 255-262.

Denis, F. and Ramet, J. P. 1989. Activité antibactérienne du système lactoperoxydase sur *Listeria monocytogenes*. Microbiol., Alim. Nutr., 7: 25-30.

Deneer, H. G. and Boychut, I. I. 1992. Reduction of iron by *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria*. Can. J. Microbiol., 39: 480-485.

Despieres, M. 1971. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans un milieu défavorable à *Streptococcus faecalis*. Ann. Inst. Pasteur, 121: 493-501.

Dhaliwal, D. S., Cordier, J. L. and Cox, L. J. 1992. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. Lett. Appl. Microbiol., 15: 217-221.

Donnelly, C. W., Baigent, G. J. and Briggs, E. H. 1988. Flow cytometry for automated analysis of milk containing *Listeria monocytogenes*. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 3: 655-658.

Dubois, B. F. et Leveau, J. Y. 1994. Les biofilms et leurs conséquences dans les industries agro-alimentaires. ADRIA , 5: 4-12

Dubos, R. 1929. The initiation of growth of certain facultative anaerobes as related to oxidation-reduction processes in the medium. J. Exp. Med., 49: 559-573.

Duffy, G, Sheridan, J. J., Buchanan, R. L., McDowell, D. A. and Blair, I. S. 1994. The effect of aeration, initial inoculum and meat microflora on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in selective enrichment broths. Food Microbiol., 11: 429-438.

Duh, Y. H. and Schaffner, D. W. 1993. Modelling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *L. monocytogenes*. J. Food Prot., 56: 205-210.

Dumont, L. E. and Slabyj, B. M. 1994. Impedimetric estimation of bacterial load in commercial carrageenan. Food Microbiol., 11: 375-383.

Dupont, J., Ménard, D., Hervé, C. and Minier, B. 1994. Analytical procedure for use conductance measurement to estimate *Escherichia coli* in shellfish. J. Appl. Bacteriol., 77: 296-302.

Dychdala, G. R. 1983. Chlorine and chlorine compounds. In S. S. Bock (ed.), Desinfection, sterilization and preservation, 3rd Ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA. pp. 157-182.

Easter, M. C. and Gibson, D. M. 1989. Detection of microorganisms by electrical measurements. Rapid methods in microbiology. Ed. Adams M. R. and Hope C.F.A., 5-100.

Easter, M. C., Gibson, D. M. and Ward F. B. 1982. A conductance method for the assay and study of bacterial trimethylamine oxide reduction. J. Appl. Bacteriol., 52: 357-365. 

Ebina, Y., Ekida, M. and Hashimoto, H. 1989. Origin of changes in electrical impedance during the growth and fermentation process of Yeast in batch culture. *Biotechnol. Bioeng.*, 33: 1290-1295.

Eerola, E. and Lehtonen, O. P. 1988. Optimal data processing procedure for automatic bacterial identification by gas-liquid chromatography of cellular fatty acids. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 1745-1753.

Eley, A. 1990. New rapid detection methods for *Salmonella* and *Listeria*. *Food Safety*, 92: 28-31.

Evans, H. A. V. 1982. A note on two uses for impedimetry in brewing microbiology. *J. Appl. Bacteriol.*, 53: 423-426.

Evans, H. A. V. 1985. A note on the use of conductimetry in brewery microbiological control. *Food Microbiol.*, 2: 19-22.

Farag, M. D. E.-D. H., Shamsuzzaman, K. and Borsa, J. 1990. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in phosphate butter, trypticase soy broth, and poultry feed. *J. Food Prot.*, 53: 648-651.

Farber, J. M. and Brown, B. E. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1584-1587.

Farber, J. M. and Peterkin, P. I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol., Rev.*, 55: 476-511.

Fedio, W. M. and Jackson, H. 1989. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9: 157-160.

Ferron, P. and Michard, J. 1993. Distribution of *Listeria* spp. in confectioner' pastries from western France: comparison of enrichment methods. *Intern. J. Food Microbiol.*, 18: 289-303.

Firstenberg-Eden, R. 1983. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol.*, 1: 64-70.

- Firstenberg-Eden, R. 1984. Collaborative study of the impedance method for examining raw milk samples. *J. Food Prot.*, 47: 407-412.
- Firstenberg-Eden, R. 1986. Electrical impedance for determining microbial quality of foods. Bactomatic, Inc. Princeton, New Jersey pages 129-144.
- Firstenberg-Eden, R. and Eden, G. 1984. Impedance microbiology. Research Studies Press Ltd. Ed. John Wiley and Sons Inc. New York.
- Firstenberg-Eden, R. and Klein, C. S. 1983a. Evaluation of a rapid impedimetric procedure for the quantitative estimation of coliforms. *J. Food Sci.*, 48: 1307-1311.
- Firstenberg-Eden, R. and Tricarico, M. 1983b. Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk. *J. Food Sci.*, 48: 1750-1754.
- Firstenberg-Eden, R., van Sise, M. L., Zindulis, J. and Kahn, P. 1984. Impedimetric estimation of coliforms in dairy products. *J. Food Sci.*, 1449-1452.
- Firstenberg-Eden, R. and Zindulis, J. 1984. Electrochemical change in media due to microbial growth. *J. Microbiol. Meth.*, 2: 103-115. 
- Fleming, D. W., Cochi, S. L., MacDonald, L., Brodum, J., Hayes, P. S., Plikaytis, B. D., Holmes, M. B., Audurier, A., Broome, C. V. and Reingold, A. L. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N. Engl. J. Med.*, 312: 404-407.
- Frank, J. F., Gillett, R. A. N. and Ware, G. O. 1990. Association of *Listeria* spp. contamination in the dairy processing plant environment with the presence of Staphylococci. *J. Food Prot.*, 53, 11: 928-932.
- Frank, J. F. and Koffi, R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.*, 53: 550-554.
- Franken, A. A. J. M. and van der Zouwen, P. S. 1993. Direct and indirect conductimetry for identification and detection of plant pathogenic bacteria., 74: 234-242.

Fraser, J. A. and Sperber, W. H. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Prot.*, 51, 10: 762-765

Fryeer, S. N. and Forde, K. 1989. Impedimetric procedures for estimating bacterial numbers and coliforms in powdered dairy products. *J. Soc. Dairy Technol.*, 42: 88-89.

Gabis, D. and Fauss, R. E. 1988. Controlling microbial growth in food processing environments. *Food Technol.*, 42, 12: 81-82.

Gatti, M. and Neviani, E. 1993. A new simple medium for the detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by measurement of conductance changes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 17: 72-74.

Gaya, P., Medina, M. and Nüñez, M. 1991. Effect of the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11: 3355-3360.

Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. and Berche, P. E. 1988. Purification, characterization and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.*, 55: 1641-1646.

George, S. M. and Lund, B. M. 1992. The effect of culture medium and aeration on growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4,5. *Lett. Appl. Microbiol.*, 15: 49-52.

Gibson, A. M. 1987. Use of conductance measurements to detect growth of *Clostridium* in a selective medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 5: 19-21.

Gibson, D. M., Ogden, I. D. and Hobbs, G. 1984. Estimation of the bacteriology quality of fish by automated conductance measurements. *Intern. J. Food. Microbiol.*, 1: 127-134.

Gnan, S. and Luedecke, L. O. 1982. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J. Food Prot.*, 45: 4-7.

Golden, D. A., Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. 1988. Inactivation and injury of *Listeria monocytogenes* as affected by heating and freezing. *J. Food Microbiol.*, 5: 7-23.

Gottardi, W. 1983. Iodine and iodine compounds. In S. S. Bock (ed.), *Desinfection, sterilization and preservation*, 3rd ed. Lea and Febiger, Philadelphia, PA. pp. 183-196.

Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, A. L., Dehaumont, P. and Veit, P. 1993. Epidémie de listériose en France. *Bul. Epidém. Hebdo.*, 4, 93: 12-14.

Goupy, J. 1988. *La méthode des plans d'expériences*. Ed. Dunod, 1-220.

Griffiths, M. W. and Phillips, J. D. 1984. Detection of post-pasteurization contamination of cream by impedimetric methods. *J. Appl. Bacteriol.*, 57: 107-114.

Gunasinghe, C. P. G. L., Henderson, C. and Rutter, M. A. 1994. Comparative study of two plating media (Palcam and Oxford) for detection of *Listeria* species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 156-158.

Hadley, W. K. and Senyk, G. 1975. Early detection of microbial metabolism and growth by measurement of electrical impedance. In Schlessinger, D. (ed), *Microbiology*. Washington, DC: Amer. Soc. Microbiol., 12-21.

Hancock, I. Bointon, B. M. and McAthey, P. 1993. Rapid detection of *Listeria* species by selective impedimetric assay. *Lett. Appl. Microbiol.*, 16: 311-314.

Hao, D. Y. Y., Beuchat, L. R. and Brackett, R. E. 1987. Comparison of media and methods for detecting and enumerating *Listeria monocytogenes* in refrigerated cabbage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 955-957.

Hayes, P. S., Graves, L. M., Swaminathan, B., Ajello, G. W., Malcolm, G. B., Weaver, R. E., Ransom, R., Deaver, K., Plikaytis, B. D., Schuchat, A., Wenger, J. D., Pinner, R. W., Broome, C. V. and the *Listeria* study group. 1992. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. *J. Food Prot.*, 55, 12: 952-959.

Henschke, P. A. and Thomas, D. S. 1988. Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *J. Appl. Bacteriol.*, 64: 123-133.

Hether N. W., Campbell B. A., Baker L. A. and Jackson L. L. 1983. Chemical composition and biological functions of *Listeria monocytogenes* cell wall preparation. *Infect. Immun.*, 39: 1114-1121.

Ho, J. L., Shands, K. N., Friedland, G., Eckland, P. and Fraser, D. W. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.*, 146: 520-524.

Huhtanen, C. N., Jenkins, R. K. and Thayer, D. W. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 52: 610-613.

Humbert, F., Salvat, G., Lalande, F., Colin, P. and Lahellec, C. 1990. Rapid detection of *Salmonella* from poultry meat products using the "1.2." Test<sup>®</sup>. *Lett. Appl. Microbiol.*, 10: 245-249.

Huys, G., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P., Falsen, E., Altwegg, M. and Kersters, K. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 10: 651-658.

Ikemoto, S., Kuiraiishi, H., Komagata, K., Azuma, R., Suto, T. and Murooka, H. 1978. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24: 199-213.

Iren, A., Watson Craik, Aidoot, K. E., Anderson, J. G. 1989. Induction of conductance and capacitance changes by food-borne fungi. *Food Microbiol.*, 6: 231-244. 

Iren, A., Watson Craik, Aidoot, K. E., Anderson, J. G. 1990. Development and evaluation of a medium for the monitoring of food-borne moulds by capacitance changes. *Food Microbiol.*, 7: 129-145. 

James, S. M., Fannin, S. L., Agee, B. A., Hall, B., Parker, E., Vogt, J., Run, G., Williams, J., Lieb, L., Salminen, C., Prendergast, T., Werner, S. B. and Chin, J. 1985. Listeriosis outbreak association with Mexican-style cheese-California. *Morbid. Mortal. Weekly Rep.*, 34: 357-359.

Jeong, D. K. and Frank, J. F. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. *J. Food Prot.*, 57, 7: 576-586.

Jensen, A. 1993. *Listeria* in faecal and genital specimens. *Med. Microbiol. Lett.*, 2: 125-130.

59-Johansen, C., Gram, L. and Meyer, A. S. 1994. The combined inhibitory effect of lysozyme and low pH on growth of *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot., 57, 7: 561-566.

Jones, D. and Seeliger, H. P. R. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology-Subcommittee on the Taxonomy of *Listeria*, *Brochothrix*, and *Erysipelothrix*. Intern. J. Syst. Bacteriol., 37: 176.

Julak, J., Ryska, M., Koruna, I. and Mencikova, E. 1989. Cellular fatty acids and fatty aldehydes of *Listeria* and *Erysipelothrix*. Zbl. Bakt., 272: 171-180.

Juneja, V. K. and Davidson, P. M. 1993. Influence of temperature on the fatty acid profile of *Listeria monocytogenes*. J. Rapid Meth. and Autom. Microbiol., 2: 73-81.

Kaneda, T. 1991. Iso and Anteiso fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. Microbiol. Rev., 55: 288-302.

Kennedy, J. E. and Oblinger, J. R. 1985. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. J. Food Prot., 48, 4: 334-340.

Khayat, F. A. and Richardson, G. H. 1986. Detection of abnormal milk with impedance microbiology instrumentation. J. Food Prot., 49, 7: 519-522.

Klausner, R. B. and Donnelly, C. W. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in vermont dairy plants. J. Food Prot., 54, 8: 607-611.

Knabel, S. J., Walker, H. W., Hartman, P. A. and Medonca, A. F. 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. Appl. Environ. Microbiol., 56: 370-376.

Knudtson, L. M. and Hartman, P. A. 1993. Antibiotic resistance among Enterococcal isolates from environmental and clinical sources. J. Food Prot. 56, 6: 489-492.

Kroll, R. G. and Patchett, R. A. 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol., 14: 224-227.

Lambin, S. and German, A. 1969. Précis de microbiologie. Volume 1, 2<sup>nd</sup> édition Masson & Cie Paris, page 70.

Lammerding, A. M. and Doyle, M. P. 1989. Evaluation of enrichment procedures for recovery of *Listeria monocytogenes* from dairy products. J. Food Microbiol., 9: 249-268.

Lawrence, A. J and Moores, G. R. 1972. Conductimetry in enzymes studies. Eur. J. Biochem., 24: 538-546.

Leasor, S. B. and Foegeding, P. M. 1989. *Listeria* species in commercially broken raw liquid whole egg. J. Food Prot., 52: 777-780.

Lee, W. H. and McClain, D. 1986. Improved *Listeria monocytogenes* selective agar. Appl. Environ. Microbiol., 11: 1215-1217.

Leighton, I. 1979. Use of selective agents for the isolation of *Listeria monocytogenes*. Med. Lab. Sci., 36: 283-288.

Linnan, M. J., Marcola, L., Xiao, D. L. and Goulet, V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N. Engl. J. Med., 319: 823-828.

Linton, R. H., Pierson, M. D. and Bishop, J. R. 1990. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott a by sublethal heat shock. J. Food. Prot., 53: 924-927.

Littel, K. J., Pilelis, S. and Spurgash, A. 1986. Bioluminescent ATP assay for rapid estimation of microbial numbers in fresh meat. J. Food Prot., 49, 1: 18-22.

Loessner, M. J., Bell, R. H., Jay, J. M. and Shelef, L. A. 1988. Comparison of seven plating media for enumeration of *Listeria* spp. Appl. Environ. Microbiol., 54: 3003-3007.

Lovett, J. 1988. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Food Technol., 4: 172-175.

Ludlam, G. B. 1949. A selective medium for the isolation of *Staphylococcus aureus* from heavily contaminated material. Mon. Bull. Min. Health, 8: 15-20.

Ludwig, W., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. 1984. 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. FEMS Microbiol., Lett., 25: 199-204.

- Lund, A. M., Zottola, E. A. and Pusch, D. J. 1990. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. J. Food Prot., 54, 8: 602-606.
- Macdonald, F. and Sutherland, A. D. 1994. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two enrichment broths. J. Dairy Res., 61: 433-436.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. and Savoie, L. 1991. Characterisation of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. Appl. Environ. Microbiol., 57: 1969-1973.
- Marshall, N., Bourdon, J. L. et Richard, D. 1987. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed Doin 3ed, page 51.
- Marshall, D. and Schmidt, R. 1988. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in milk preincubated with selected Pseudomonads. J. Food Prot., 51, 3: 277-282.
- Martin, S. E., Flowers, R. S. and Ordal, Z. J. 1976. Catalase: its effect on microbial enumeration. Appl. Environ. Microbiol., 32: 731-734.
- Martin, J. F. and Hearnberger, J. O. 1993. Evaluation of impedance microbiology for rapid assessment of shelf-life and quality of processed channel catfish, *Ictalurus punctatus*. J. Appl., Aquacult., 3, 3/4: 353-362.
- Martin, A. and Katz, S. E. 1993. Rapid determination of *Listeria monocytogenes* in foods using a resuscitation/selection/kit system detection. J. AOAC Intern. 76, 3: 632-636.
- Martins, S. B., Hodapp, S., Dufour, S. W. and Kraeger, S. J. 1982. Evaluation of a rapid impedimetric method for determining the keep quality of milk. J. Food Prot., 45, 13: 1221-1226.
- Martins, S. B. and Selby, M. J. 1980. Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. Appl. Environ. Microbiol., 3: 518-524.
- Maury, M. 1987. Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. Microbiologie Immunologie. Diagnostics Pasteur 3<sup>e</sup> éd., 253-255.

McBride, M. E. and Gerard, K. F. 1960. Selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. J. Lab. Clin. Med., 55: 153-157.

McCarthy, S. A. 1992. Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. Food Technol., 12: 84-87.

McClain, D. and Lee, W. H. 1988. Development of USDA-FSIS method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat. J. Assoc. Off. Chem., 71: 876-879.

McPhillips, J. and Snow, N. 1958. Studies on milk with a new type of conductivity cell. Australian J. Dairy Technol., 3: 192-196.

Miller, I. L. and Silverman, S. J. 1959. Glucose métabolisme of *Listeria monocytogenes*. Bacteriol., Proc., 103.

Miskimin, D. K., Berkowitz, K. A., Solberg, M., Riha, Jr W. E., Franke, W. C., Buchanan, R. L. and O'leary, V. 1976. Relationship between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. J. Food Sci., 41: 1001-1006.

Mitchell, B. A., Milbury, J. A., Brookins,, A. M. and Jackson, B. J. 1994. Use of immunomagnetic capture on beads to recover *Listeria* from environmental samples. J. Food Prot., 57, 8: 743-745.

Moss, C. W. and Cherry, W. B. 1968. Characterization of the C<sub>15</sub> branched-chain fatty acids of *Corynebacterium acnes* by gas chromatography. J. Bacteriol., 95: 241-242.

Moss, C. W., Dowell, V. R., Lwis, Jr. V. J. and Schekter, M. A. 1967. Cultural characteristics and fatty acid composition of *Corynebacterium acnes*. J. Bacteriol., 94: 1300-1305.

Mossel, D. A. A. 1967. Ecological principles and methodological aspects of the examination of foods and feeds for indicator microorganisms. J. Amer. Off. Assoc Chem., 50, 1: 91-104.

Mosteller, T. M., Bishop, J. R. and Gaspar-Rolle, N. 1994. Use of impedance microbiology for the detection of biofilms. Dept. of Food Sci. and Technol. Virginia Techn. Blacksburg, VA 24061.

Nieuwenhof, F. F. J. and Hoolwerf, J. D., 1987. Impedance measurement as an alternative to the plate count method for estimating the total count of bacteria in raw milk. *J. Food Prot.*, 50: 665-668.

Ninet, B., Traitler, H., Aeschlimann, J. M., Horman, I., Hartmann, D. and Bille, J. 1992. Quantitative analysis of cellular fatty acids (CFAs) composition of the seven species of *Listeria*. *Sytem. Appl. Microbiol.*, 15: 76-81.

Noble, P. A., Ashton, E., Davidson, C. A. and Albritton, W. L. 1991. Heterotrophic plate counts of surface water samples by using impedance methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11: 3278-3291.

Norrung, B., Solve M., Ovesen, M. and Skovgaard, N. 1991. Evaluation of an Elisa test for detection of *Listeria* spp. *J. Food Prot.*, 54, 10: 752-755.

O'Connor, F. 1979. An impedance method for the determination of bacteriological quality of raw milk. *J. Food Sci. Technol.*, 3: 93-100.

Ogden, I. D. 1986. Use of conductance methods to predict bacterial counts in fish. *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 263-268.

Ogden, I. D. 1988. A conductance medium to distinguish between *Salmonella* and *Citrobacter* spp. *Intern. J. Food Microbiol.*, 7: 287-297.

Ogden, I. D. 1993. A conductance assay for the detection and enumeration of *Escherichia coli*. *Food Microbiol.*, 10: 321-327.

Ogden, I. D. and Cann, D. C. 1987. A modified conductance medium for the detection of *Salmonella* spp. *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 459-464.

Oker-Blom, M. 1912. Die electrische Leitfähigkeit im dienste der bakteriologie. *Centralbl. J. Bakteriol. Abst I.*, 65: 382-389.

Okigbo, O. N. and Richardson, G. H. 1985. Detection of Penicillin and Streptomycin in milk by impedance microbiology<sup>1,2</sup>. *J. Food Prot.*, 48, 11: 979-981.

Owens, J. D. 1985. Formulation of culture media for conductimetric assays: Theoretical considerations. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 3055-3076.

Owens, J. D., Miskin, D. R., Wachter-Viveros, M. C. and Bengel, L. C. A. 1985. Sources of conductance changes during bacterial reduction of trimethylamine oxide to trimethylammonium in phosphate buffer. *J. Gen. Microbiol.*, 131: 1357-1361.

Owens, J. D., Thomas, D. S., Thompson, P. S. and Timmerman, J. W. 1989. Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial populations. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9: 245-249.

Owens, J. D. and Wachter-Viveros, M. C. 1986. Selection of pH buffers for use in conductimetric microbiological assays. *J. Appl. Bacteriol.*, 60: 395-400.

Palumbo, S. A. and Williams, A. C. 1990. Effect of temperature, relative humidity and suspending menstrua on the resistance of *Listeria monocytogenes* to drying. *J. Food Prot.*, 53: 377-381.

Parsons, L. B., Drake, E. T. and Sturges, W. S. 1929. A bacteriological conductivity culture cell and some of its applications. *J. Amer. Chem. Soc.*, 51: 166-171. X

Parsons, L. B. and Sturges, W. S. 1925. Conductivity as applied to studies of bacterial metabolism. 27th annual meeting of the society of American Bacteriologists, Madison, Wisconsin, 12: 267-272. X

Parsons, L. B. and Sturges, W. S. 1926. The possibility of the conductivity method as applied to studies of bacterial metabolism. *J. Bacteriol.*, 11: 177-188. X

Patchett, R. A., Kelly, A. F. and Kroll, R. G. 1989. Investigation of a simple amperometric electrode system to rapidly quantify and detect bacteria in food. *J. Appl. Bacteriol.*, 66: 49-55.

Patin, S. M., Deschamps, N., Tatini, S. R. and Richard, J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait*, 72: 249-263.

Patterson, M. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate-butter saline. *Lett. Appl. Microbiol.*, 8: 181-184.

Perez-Diaz, J. C., Vincente, M. F. and Baquero, F. 1982. Plasmids in *Listeria*. *Plasmid*, 8: 112-118.

- Petersen, S. O and Klug, M. J. 1994. Effects of sieving, storage, and incubation on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 12: 2421-2430.
- Petran, R. L. and Swanson, K. M. J. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*. *J. Food Prot.*, 56: 616-618.
- Phillips, J. D. and Griffiths, M. W. 1985. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelf-life of pasteurized milk and cream. *Food Microbiol.*, 2: 39-51.
- Phillips, J. D. and Griffiths, M. W. 1989. The rapid demonstration and presumptive identification of *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 9: 28-31.
- Piffaretti, J. C., Kressbuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J. M., Selander, R. K. and Rocourt, J. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3818-3822.
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B. and Daneschvar, M. I. 1988. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can. J. Microbiol.*, 35: 245-254.
- Piton, C. et Dasen, A. 1988. Evaluation de la mesure d'impédance comme technique rapide d'appréciation de la qualité bactériologique du lait cru. *Lait*, 4: 467-484.
- Gibson G. M. 1987. Some modification to the media for rapid automated detection of *Salmonellas* by conductance measurement. *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 299-304.
- Pless, P., Futschik, K. and Schöpe, E. 1994. Rapid detection of *Salmonellae* by means of a new impedance-splitting method. *J. Food Prot.*, 57, 5: 369-376.
- Powell, S. 1990. Use of conductance technique for rapid detection of food-borne pathogens. *European Food and Drink review*, Winter, 67-73.
- Poyski, F. T., Paranjpye, R. N., Lashbrook, L. C., Peterson, M. E., Pelroy, G. A. and Eklund, M. W. 1993. Selective en differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods. *J. Food Prot.*, 56: 326-329.

Premaratne, R. J., Lin, W. J. and Johnson, E. A. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., 10: 3046-3048.

Proctor, V. A. and Cunningham, F. E. 1988. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. Food Sci. Nutr., 26: 359-395.

Püttmann, M., Ade, N. and Hof, H. 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria* spp. on growth temperature. Res., Microbiol., 144: 279-283.

Raines, L. J., Moss, C. W., Farshtchi, D. and Pittman, B. 1968. Fatty acids of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol., 12: 2175-2177.

Ranga, J. P., Wei-jen, L. and Eric, A. J. 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl. Env. Microbiol., 10: 3046-3048.

Ravomanana, D., Richard, N. and Rosec, J. P. 1993. *Listeria* spp. dans des produits alimentaires. Etude comparative de différents protocoles de recherche et d'une méthode rapide par hybridation nucléique. Microbiol. Alim.Nutr., 11: 57-70.

Regnault, J. P. 1990. Microbiologie générale. Ed. Vigot page 36.

Richards, J. C. S., Jason, A. C., Hobb,s G., Gibson, D. M. and Christie, R. H. 1978. Electronic measurement of bacterial growth. J. Phys. Electr.: Sci. Instrum., 11: 560-569.

Rocourt, J. 1988. Taxonomy of the genus *Listeria*. Infection, 16, suppl., 2: 89-91.

Rocourt, J. 1989a. *Listeria* et Listériose humaine. Ann. Inst. Past. Act., 25-30

Rocourt, J. 1989b. Listériose humaine: aspects cliniques et épidémiologiques. Rôle de l'alimentation. Biol., 179: 29-40.

Rocourt, J. Audurier, A. Courtieu, A. L., Durst, J., Ortel, S., Schrettenbrunner, A. and Taylor, A. G. 1985. A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. Ser. A., 259: 489-497.

Rossen, L., Holmstrom, K., Olsen, J. E. and Rasmussen, O. F. 1991. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. Intern. J. Food Microbiol., 14: 145-152.

Ryser, E. T. and Marth, E. H. 1991. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes* Marcel DEKKER Inc. Ed. *Listeria*, Listeriosis and food safety, 194-239.

Ryser, E. T., Marth, E. H. and Doyle, M. P. 1985. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of cheese. J. Food Prot., 48: 746-750.

Schaertel, B. J., Tsang, I. U. and Firstenberg-Eden, R. 1987. Impedance detection of yeast and mould. Food Microbiol., 4: 155-163.

Schlech, W. F., Lavigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C. Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W., Johnson, S. E., King, S. H., Nicholls, E. S. and Broome, C. V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med., 308: 203-206.

Schwan, H. P. 1966. Alternating current electrode polarization. Biophysik, 3: 181-201.

124-Schwartz, D. 1993. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Méd. Sc. Flam., 4e éd., 74-88.

Seeliger, H. P. R., and Jones, D. 1986. *Listeria* in Bergey's manual<sup>®</sup> of systematic bacteriology. Ed. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E. and Holt J. G. W and Wilkins Baltimore M. D. USA vol., 2: 1235-1245.

Selanger, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. and Whittman, T. S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol., 51: 873-884.

Silverman, M. P. and Munoz, E. F. 1979. Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage. Appl. Environ. Microbiol., 3: 521-526.

Skjerve, E. L. M. and Olsvik, O. 1990. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol., 56: 3478-3481.

Spreekens, K. J. A. and Stekelenburg, F. K. 1986. Rapid estimation of fresh fish by impedance measurements. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24: 95-96.

Stead, D. E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Intern. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 281-295.

Steward, G. N. 1899. The change produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of culture media. *J. Exp. Med.*, 4: 235-245.

Strassburger, J., Hossbach, J. and Rosmarie, S. 1991. Application of impedimetry to rapid assessment of liquid culture media. *Zbl., Bakt.*, 274: 481-489.

Suhren, G. and Heeschen, W. 1985. Zur impedanz als messgrösse für die bakteriologische untersuchung von milch und milchprodukten. *Dtsch. Mol. Ztg.*, 51, 52: 1710-1717.

Suhren, G. and Heeschen, W. 1987. Impedance assays and the bacteriological testing of milk and milk products. *Milchwissenschaft*, 42: 619-627.

Sword, C. P. 1966. Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection. *J. Bacteriol.*, 92: 536-542.

Theron, D. P., Prior, B. A. and Lategan, P. M. 1986a. Determination of bacterial ATP levels in raw milk: selectivity of non-bacterial ATP hydrolysis. *J. Food Prot.*, 49, 1: 4-7.

Theron, D. P., Prior, B. A. and Lategan, P. M. 1986b. Sensitivity and precision of bioluminescent techniques of enumeration of bacterial in skim milk. *J. Food Prot.*, 49, 1: 8-11.

Throm, R., Specter, S., Strauss, R. and Friedman, H. 1977. Detection of bacteriuria by automated electrical impedance monitoring in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 10: 271-273.

Trivett, T. L., and Meyer, E. A. 1971. Citrate cycle and related metabolism of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.*, 107: 770-779.

Tuncan, E. U. 1993. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor and chlorine on *Listeria*. J. Food Prot., 56, 12:1029-1033.

Ur, A. 1970a. Determination of blood coagulation using electrical impedance measurements. Biomed., Eng., 5: 342.

Ur, A. 1970b. Changes in the electrical impedance of blood during coagulation. Nature,  $\alpha$  London, 226: 269-270.

Ur, A. and Brown, D. F. J. 1973. New approaches to the identification of microorganisms. Ed CARL GORAN HEDEN, Tibor Illoli 1975: 61-71, John Wiley and sons, New York.

Ur, A. and Brown, D. F. J. 1975. Impedance monitoring of bacterial activity. J. Med. Microbiol., 8: 19-28.

van Netten, P., Perales, I. and Mossel, D. A. A. 1988. An improved selective and diagnostic medium for isolation and counting of *Listeria* spp. in heavily contaminated foods. Lett. Appl. Microbiol., 7: 17-21.

van Netten, P., Perales, I., van de Moosdijk, A., Curtis, G. D. W. and Mossel, D. A. A. 1989. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. Intern. J. Food Microbiol., 8: 299-316

Vogel, R. A. and Johnson, M. 1960. In a modification of the tellurite glycine medium for use in the identification of *Staphylococcus aureus*. Publ. Health Labo., 18: 131.

257-von Graevenitz, A., Osterhout, G. and Dick, J. 1991. Grouping of some clinically relevant Gram-positive rods by automated fatty acid analysis. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand., 99: 147-154.

Warburton, D. W., Farber, J. M., Armstrong, A., Caldeira, R., Hunt, T., Messier, S., Plante, R., Tiwari, N. P. and Vinet, J. 1991. A comparative study of the FDA and USDA methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Inter. J. Food Microbiol., 13: 105-118.

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

Weihe, J. L., Seibt, S. L. and Hatcher, Jr W. S. 1984. Estimation of microbial populations in frozen concentrated orange juice using automated impedance measurements. J. Food Sci., 49: 243-245.

Welshimeri, H. J. 1963. Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol., 85: 1156-1159.

Wenzel, J. M. and Marth, E. H. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes*. in the presence of lactic acid bacteria in an agitated medium with internal pH control. J. Food Microbiol., 54, 3: 183-188.

Wesley, I. V. and Ashton, F. 1991. Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* associated with foodborne epidemics. Appl. Environ. Microbiol., 57: 965-975.

Wheeler, T. G. and Goldschmidt, M. C. 1975. Determination of bacterial cell concentration by electrical measurements. J. Clin. Microbiol., 1: 25-29

Wijtzes, T., McClure, P. J., Zwietering, M. H. and Roberts, T. A. 1993. Modeling bacterial growth of *Listeria monocytogenes* as a function of water activity, pH and temperature. Intern. J. Food Microbiol., 18: 139-149.

Wilhelms, D and Sandow, D. 1989. Preliminary studies on monocine typing of *Listeria monocytogenes* strains. Acta Microbiol. Hung., 36: 235-238.

Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J. and Kersters, K. 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. Syst. Appl. Microbiol., 16: 47-71.

Youssef, A. E. and Marth, E. H. 1988. Inactivation of *Listeria monocytogenes* by ultraviolet energy. J. Food Sci., 53: 571-573.

Yu, L. S. L. and Fung, D. Y. C. 1991a. Oxyrase enzyme and motility enrichment Fung-yu tube for rapid detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. J. Food Safety, 11: 149-162.

Yu, L. S. L. and Fung, D. Y. C. 1991b. Effect of oxyrase enzyme on *Listeria monocytogenes* and other facultative anaerobes. J. Food Safety, 11: 163-175.

Yu, L. S. L. and Fung, D. Y. C. 1992. Comparisons of selected methods with the Fung-Yu tube procedure for determining *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meats. J. Food Prot., 55, 5: 349-355.

Yu, L. S. L. and Fung, D. Y. C. 1993. Five-tube most-probable-number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage. Intern. J. Food Microbiol., 18: 97-106.

Zebovitz, E., Evans, J. B. and Niven, C. F. 1955. Tellurite-glycine agar: a selective plating medium for the quantitative detection of coagulase-positive Staphylococci. J. Bacteriol., 70: 686-690.

Zindulis, J. 1984. A medium for the impedimetric detection of yeasts in foods. Food Microbiol., 1: 159-167.

# ANNEXES

# ANNEXE

## Milieu AC (Acriflavine Ceftazidime)

### Formule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5

pH= 7,3+/-0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

### Ajouter aseptiquement pour un litre de base:

- 2,5 ml d'une solution aqueuse contenant 10 mg d'hydrochloride d'acriflavine (Sigma)
- 2,5 ml d'une solution aqueuse contenant 50 mg de pentahydrate de ceftazidime (Glaxo)

## **Milieu A.S.L.M. (Al-Zoreky-Sandine-Listeria-Medium)**

### **Formule en g/l:**

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Esculine	1
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Chlorure de lithium	15

Autoclaver 15 minutes à 121°C

### **Ajouter aseptiquement pour un litre de base:**

- 5 ml d'ethanol absolu aqueux (1/1) contenant 100 mg de cycloheximide (Sigma)
- 2,5 ml d'une solution aqueuse contenant 50 mg de pentahydrate de ceftazidime
- 2,5 ml d'une solution aqueuse contenant 10 mg d'hydrochloride d'acriflavine
- 2 ml d'une solution à 1% de moxalactame (Sigma) dans un tampon phosphate (pH= 6)

## Milieu CC (Bouillon Cerveau-Coeur)

### Formule en g/l:

-Infusion de cervelle de veau	12,5
-Infusion de coeur de boeuf	5
-Protéose-peptone	10
-Glucose	2
-Chlorure de sodium	5
-Phosphate dissodique	2,5

pH= 7,4 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

# EAU PHYSIOLOGIQUE

## (Tampon physiologique)

Formule en g/l:

-Chlorure de sodium 8,5

pH= 7,2 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

## MILIEU BASE FRASER

### 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
-Chlorure de lithium	3

pH= 7,2+/- 0,2

Reconstituer le milieu deshydraté selon les indications du fabricant. Repartir 225ml dans des flacons. Autoclaver 15min à 121°C. Refroidir à 45-50°C. Ajouter les suppléments sélectifs:

### Supplément sélectif demi-Fraser SR 166G

Citrate ferrique ammoniacal	1,125g
Acide nalidixique	22,5mg
Acriflavine	28,125mg

### Supplément sélectif Fraser complet SR 156E

Citrate ferrique ammoniacal	10mg
Acide nalidixique	12,5mg
Acriflavine	250,0mg

Réconstituer stérilement les flacons SR 166G et SR 156E respectivement par 20ml et 5ml de mélange éthanol/eau distillée stérile à parties égales. Mélanger doucement jusqu'à dissolution complète. Ajouter stérilement les contenus des flacons à 2,25 litres et 500ml de bouillon Fraser respectivement par le SR 166G et SR 156E.

## **Bouillon LEB (Listeria enrichment broth)**

### **Formule en g/l:**

-Hydrolysate trypsique de caséine	17
-Peptone papainique de soja	3
-Chlorure de sodium	5
-Phosphate de potassium	2,5
-Glucose	2,5
-Extrait de levure	6

pH= 7,3 +/- 0,2

Reconstituer le milieu deshydraté selon les indications du fabricant. Repartir 225ml dans des flacons. Autoclaver 15min à 121°C. Refroidir à 45-50°C. Ajouter le supplément sélectif:

### **Supplément sélectif LEB 11781**

Acide nalidixique	20mg
Acriflavine	5mg
Cycloheximide	25mg

Réconstituer stérilement un flacon par 1ml d'eau distillée stérile. Mélanger doucement jusqu'à dissolution complète. Ajouter stérilement le contenu d'un flacon à 500ml de bouillon LEB.

# GÉLOSE M.R.S. (Man Rogosa Sharpe, 1960)

## Formule en g/l:

-Peptone bactériologique	10,0	
-Extrait de viande		10,0
-Extrait de levure		5,0
-Acétate de sodium		5,0
-Phosphate dipotassique	2,0	
-Citrate d'ammonium		2,0
-Sulfate de magnésium	0,10	
-Sulfate de manganèse	0,05	
-Glucose		20,0
-Tween 80		1 ml
-Agar		13,0

pH =6,2 +/- 0.2

Autoclaver 15 min à 121°C

## Milieu MVJ (Modified Vogel Johnson)

### Formule en g/l:

-Tryptone		10
-Extrait de levure		5
-Mannitol		10
-Phosphate dipotassique	5	
-Chlorure de lithium		5
-Glycine		10
-Rouge de phénol		0,025

pH = 7,1 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

### Ajouter aseptiquement à 980 ml de base:

- 50 mg d'acide nalidixique
- 20 mg de bacitracine
- 20 ml de tellurite de potassium à 1%

## **Gélose O.G.A.** **(Gélose glucosée à l'oxytétracycline)**

### **Formule en g/l:**

-Extrait de levure	5,0
-Glucose	20,0
-Agar	16

pH = 7,0 +/- 0,2

Autoclaver 20 min à 121°C

### **Ajouter aseptiquement à 100ml de milieu de base:**

-10ml d'une solution stérile d'Oxytétracycline (Tétracycline) à 0,1%. Mélanger soigneusement et couler en boîtes de pétri stériles.

# Milieu OXFORD

## Fomule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Esculine	1
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Chlorure de lithium	15

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
- 1mg de cefotetan
- 5 mg de fosfomycine

## Milieu OXB (OXFORD Modifié)

### Formule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Esculine	1
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Chlorure de lithium	3,0

pH=7,2 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

### Ajouter aseptiquement à un litre de base:

- 10 mg de colistine
- 15 mg de moxalactame

Ces antibiotiques sont apportés à la base dans 4 ml d'eau distillée (Supplément SRI57)

## Milieu PALCAM

### Formule en g/l:

-Peptones	23
-Amidon	1
-Chlorure de sodium	5
-Extrait de levure	3
-Glucose	0,5
-Esculine	0,8
-Citrate de fer ammoniacal	0,5
-Mannitol	10
-Rouge de phénol	0,08
-Chlorure de lithium	15

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

## **GELOSE P.C.A. (Plate Count Agar)**

**Formule en g/l:**

-Peptone	5
-Extrait de levure	2,5
-Glucose	1
-Agar	15

pH=7,0 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

## Solution neutralisante

### Formule en g/l:

-Hydrolysate trypsique de caséine	17
-Bacto Peptone	1
-Chlorure de sodium	5
-Lecithine	7
-Thiosulfate de sodium	6
-Tween 80	5

## Bouillon T.S (Bouillon Tryptone sel)

Formule en g/l:

-Pastone	1
-Chlorure de sodium	8,5

pH= 7,2 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

# Gélose T.S.A. (Gélose Trypto-caséine -soja)

## Formule en g/l:

-Hydrolysats trypsique de caséine	15
-Peptone de soja	5
-Chlorure de sodium	5
-Agar	15

pH= 7,3 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

## Bouillon T.S.B (Bouillon Trypto-caséine -soja)

### Formule en g/l:

-Hydrolysate trypsique de caséine	17
-Peptone de soja	3
-Chlorure de sodium	5
-Phosphate de potassium	2,5
-Glucose	2,5

pH= 7,3 +/- 0,2

Autoclaver 15 minutes à 121°C

# MILIEU BASE UVM (University Vermont Medium)

## 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

pH= 7,2+/- 0,2

Reconstituer le milieu deshydraté selon les indications du fabricant. Repartir 225ml dans des flacons. Autoclaver 15min à 121°C. Refroidir à 45-50°C. Ajouter le supplément sélectif:

## Supplément sélectif UVM SR 142E

Acide nalidixique	10mg
Acriflavine	6,0mg

Réconstituer stérilement un flacon par 5ml de mélange éthanol/eau distillée stérile à parties égales. Mélanger doucement jusqu'à dissolution complète. Ajouter stérilement le contenu d'un flacon à 500ml de bouillon UVM.

