

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC**

**MÉMOIRE  
PRÉSENTÉ À  
L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE**

**PAR**

**HENRIQUE BRANDÃO AREAL**

**ÉTUDE DES EFFETS DE L'IRRADIATION GAMMA ( $^{60}\text{Co}$ ) SUR  
LISTERIA MONOCYTOGENES CONTAMINANT LA CREVETTE**

**DÉCEMBRE 1993**

---

À ma petite princesse Cassandra.



**"\_ Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons."**

**Antoine de Saint-Exupéry**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	iv
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	vii
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	ix
<b>LISTE DES ANNEXES</b> .....	xii
<b>SOMMAIRE</b> .....	xiii
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>1 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
<b>1.1 PERSPECTIVE HISTORIQUE</b> .....	4
<b>1.2 CARACTÉRISATION DE L. MONOCYTOGENES</b> .....	7
<b>1.2.1 Taxonomie</b> .....	7
1.2.1.1 Sérotypie .....	12
1.2.1.2 Lysotypie .....	15
<b>1.2.2 Morphologie et coloration</b> .....	16
<b>1.2.3 Exigence nutritionnelle</b> .....	17
<b>1.2.4 Profil biochimique</b> .....	20
<b>1.3 CROISSANCE ET SURVIE DE L. MONOCYTOGENES</b> .....	23
<b>1.4 LISTÉRIOSES</b> .....	30
1.4.1 Écologie et épidémiologie .....	30
1.4.2 Pathologies animales et humaines .....	31
1.4.2.1 Pathologies animales .....	31
1.4.2.2 Pathologies humaines .....	31
<b>1.5 MÉTHODES DE DÉPISTAGE DE LISTERIA SPP.</b> <b>DANS LES ALIMENTS</b> .....	34
<b>1.5.1 Méthodes conventionnelles de dépistage</b> .....	35
1.5.1.1 Plan d'échantillonnage .....	35
1.5.1.2 Enrichissement .....	36
1.5.1.2.1 Enrichissement au froid .....	36
1.5.1.2.2 Enrichissement sélectif au "chaud" .....	39
1.5.1.3 Isolement sélectif .....	40
1.5.1.4 Identification .....	42
<b>1.5.2 Méthodes de détection rapide</b> .....	44
<b>1.6 L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE ET L. MONOCYTOGENES</b> .....	50
1.6.1 Les fruits de mer et <i>Listeria monocytogenes</i> .....	53
<b>1.7 IRRADIATION ET RADIORÉSISTANCE DE</b> <b>L. MONOCYTOGENES</b> .....	55

<b>2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	60
<b>2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES</b> .....	60
<b>2.2 PRÉPARATION DES CULTURES</b> .....	60
2.2.1 Culture stock .....	61
2.2.2 Culture-mère .....	61
2.2.3 Culture de travail .....	62
<b>2.3 PRÉPARATION DES BOÎTES DE PÉTRI</b> .....	63
<b>2.4 COURBES DE CROISSANCE</b> .....	64
<b>2.5 ÉTUDE DE LA RADIOSENSIBILITÉ DE L.</b> <b>MONOCYTOGENES</b> .....	66
2.5.1 Préparation de la suspension dans le BTS-EL .....	66
2.5.2 Préparation de la suspension dans la solution physiologique .....	67
2.5.3 Préparation de la crevette .....	68
2.5.3.1 Préparation, contamination artificielle et stérilisation des échantillons de crevette entière .....	69
2.5.3.2 Préparation, contamination artificielle et stérilisation des échantillons de crevette homogénéisée .....	71
<b>2.6 TRAITEMENTS IONISANTS</b> .....	72
<b>2.7 DOSIMÉTRIE</b> .....	76
<b>2.8 COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE DÉPISTAGE</b> .....	76
2.8.1 Préparation, contamination artificielle et traitement des échantillons de crevette .....	76
<b>3 - RÉSULTATS</b> .....	81
<b>3.1 COURBES DE CROISSANCE</b> .....	81
<b>3.2 ÉTUDE DE LA RADIORÉSISTANCE</b> .....	86
<b>3.3 COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE</b> <b>DÉPISTAGE DE L. MONOCYTOGENES</b> .....	99
<b>4 - DISCUSSION</b> .....	103
<b>5 - CONCLUSION</b> .....	116
<b>6 - REMERCIEMENTS</b> .....	120
<b>7 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	122

<b>8 - ANNEXES</b> .....	133
<b>Annexe I</b> .....	133
<b>Annexe II</b> .....	134
<b>Annexe III</b> .....	135

**LISTE DES TABLEAUX**

<b>TABLEAU 1-I</b>	<b>14</b>
Sérotypes de <i>Listeria</i> spp.	
<b>TABLEAU 1-II</b>	<b>22</b>
Diagnostic différentiel des espèces du genre <i>Listeria</i> .	
<b>Tableau 1-III</b>	<b>25</b>
Thermorésistance de <i>Listeria monocytogenes</i> dans les aliments.	
<b>TABLEAU 1-IV</b>	<b>38</b>
Récupération de <i>Listeria monocytogenes</i> stressée par la chaleur, à partir de la crevette artificiellement contaminée.	
<b>TABLEAU 3-I</b>	<b>95</b>
Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy des souches ATCC 19115 et 19111 et FDA-1A1 traitées en phase exponentielle dans BTS-EL à 0°C et récupérées sur trois milieux gélosés.	
<b>TABLEAU 3-II</b>	<b>95</b>
Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy des souches ATCC 19115 et 19111 et FDA-1A1 traitées en phase stationnaire dans BTS-EL à 0°C et récupérées sur quatre milieux gélosés.	

<b>TABLEAU 3-III</b>	<b>96</b>
Variations de la radiorésistance de <i>L. monocytogenes</i> en fonction de l'intervalle de dose de traitement et du milieu gélosé de récupération.	
<b>TABLEAU 3-IV</b>	<b>97</b>
Comparaison des valeurs de la DRD (kGy) pour la souche FDA-1A1 traitée en phase stationnaire à 0°C dans quatre environnements d'irradiation différents.	
<b>TABLEAU 3-V</b>	<b>97</b>
Comparaison des valeurs de la DRD (kGy) pour la souche ATCC 19115 traitée en phase stationnaire à 0°C dans deux environnements d'irradiation différents.	
<b>TABLEAU 3-VI</b>	<b>98</b>
Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy pour les souches ATCC 19115 et FDA-1A1 traitées en phase stationnaire à 0°C et à -20°C dans la crevette homogénéisée et récupérée sur deux milieux gélosés.	
<b>TABLEAU 3-VII</b>	<b>101</b>
Niveau de contamination avant et après ionisation dans les échantillons de crevette homogénéisée et artificiellement contaminée avec la souche ATCC 19115.	
<b>TABLEAU 3-VIII</b>	<b>102</b>
Étude comparative sur l'efficacité de trois méthodes d'isolement de <i>L. monocytogenes</i> pour dépister la souche ATCC 19115 présente dans de la crevette homogénéisée, contaminée artificiellement, congelée à -20°C et traitée par rayonnement gamma.	

**LISTE DES FIGURES**

<b>FIGURE 2a)</b>	<b>80</b>
Schéma des différentes étapes du protocole de recherche pour l'isolement et le dénombrement de <i>Listeria monocytogenes</i> par les méthodes FDA, USDA, E. FROID, NPP et D. DIRECT.	
<b>FIGURE 3a)</b>	<b>83</b>
Courbes de croissance de la souche 19115 cultivée dans le BTS-EL à 30°C et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.	
<b>FIGURE 3b)</b>	<b>84</b>
Courbes de croissance de la souche 19111 cultivée dans le BTS-EL à 30°C et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford, LPM.	
<b>FIGURE 3c)</b>	<b>85</b>
Courbes de croissance de la souche FDA-1A1 cultivée dans le BTS-EL à 30°C et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.	
<b>FIGURE 3d)</b>	<b>89</b>
Courbes de réduction de la population de la souche 19115 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.	
<b>FIGURE 3d')</b>	<b>89</b>
Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19115 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.	

**FIGURE 3e) 90**

Courbes de réduction de la population de la souche 19115 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.

**FIGURE 3e') 90**

Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19115 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

**FIGURE 3f) 91**

Courbes de réduction de la population de la souche 19111 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3f') 91**

Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19111 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

**FIGURE 3g) 92**

Courbes de réduction de la population de la souche 19111 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3g') 92**

Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19111 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.



**FIGURE 3h) 93**

Courbes de réduction de la population de la souche FDA-1A1 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3h') 93**

Droites de régression linéaire et DRD de la souche FDA-1A1 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

**FIGURE 3i) 94**

Courbes de réduction de la population de la souche FDA-1A1 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.

**FIGURE 3i') 94**

Droites de régression linéaire et DRD de la souche FDA-1A1 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

**LISTE DES ANNEXES**

<b>Annexe I</b>	<b>133</b>
Quelques milieux de cultures liquides pouvant être utilisés pour l'enrichissement au froid de <i>Listeria monocytogenes</i> à 4°C.	
<b>Annexe II</b>	<b>134</b>
Quelques milieux de cultures liquides pouvant être utilisés pour l'enrichissement sélectif au chaud (30 à 37°C) de <i>Listeria monocytogenes</i> .	
<b>Annexe III</b>	<b>135</b>
Quelques milieux gélosés sélectifs pouvant être utilisés pour l'isolement de <i>Listeria monocytogenes</i> .	

## SOMMAIRE

Des études de radiobiologie ont été réalisées avec trois souches de *Listeria monocytogenes*. Les souches ATCC 19115 et ATCC 19111, isolées, respectivement, de l'humain et du poulet, provenaient de l'American Type Culture Collection. La troisième, souche FDA-1A1, a été isolée de la crevette et nous a été gracieusement fournie par le Dr. Susan McCarthy de l'agence américaine "Food and Drug Administration" (FDA). La radiorésistance des souches a été déterminée sous diverses conditions expérimentales.

Les valeurs des Doses de Réduction Décimale (DRD) obtenues pour les souches traitées au rayonnement gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) dans un bouillon Trypticase Soya enrichi de 0,6% d'extrait de levure (BTS-EL) à 0°C, ont clairement démontré que les cellules, en début de la phase stationnaire, sont plus radiorésistantes que celles en pleine croissance exponentielle. On a également constaté une différence marquée des radiorésistances entre les souches, ATCC 19115 > ATCC 19111 > FDA 1A1 et aussi que la valeur de la DRD était intimement liée au milieu gélosé sur lequel on récupérait les cellules ayant survécu au stress provoqué par l'ionisation. Les milieux gélosés sélectifs Oxford, LPM et Palcam, largement utilisés pour isoler *Listeria spp.*, en raison de leur composition, constituent une source supplémentaire de stress lors de l'isolement direct des cellules traitées. De par sa composition, le milieu gélosé Palcam s'est avéré très sélectif, ne favorisant point la croissance de la souche ATCC 19111.

Les suspensions cellulaires ont démontré une radiorésistance réduite lorsqu'elles

ont été traitées dans la solution physiologique, à 0 et à -20°C. Contrairement à ce qui a déjà été observé par d'autres chercheurs, avec d'autres souches de *L. monocytogenes* chez le poulet et chez le boeuf haché, la DRD des souches ATCC 19115 et FDA-1A1 dans la crevette ne s'est pas avérée plus élevée que dans le bouillon de culture. En réduisant la température des échantillons de crevette de 0 à -20°C, on a vu doubler la radiorésistance des souches. En effet, la DRD de la souche ATCC 19115 est passée de 0,355 à 0,840 kGy et celle de la souche FDA 1A1 de 0,266 à 0,736 kGy. Nous avons constaté ce même phénomène, lors de l'irradiation de *L. monocytogenes* dans la solution physiologique. Si la congélation freine la prolifération microbienne, elle réduit aussi de manière importante les effets de la radurisation sur *L. monocytogenes*. Un tel constat est important vu que déjà en France, on permet la radurisation de la crevette à la condition que le traitement soit fait à des températures inférieures à -18°C.

Pour établir le protocole visant le dépistage de *L. monocytogenes*, on s'est appuyé sur l'Arrêté du 2 octobre 1990, signé, entre autres, par le Ministre de l'Agriculture de France, lequel permet la radurisation de la crevette congelée à -18°C, à des doses égales ou inférieures à 5 kGy. On a aussi comparé l'efficacité de deux des méthodes de dépistage de *L. monocytogenes* (FDA, USDA) les plus utilisées dans les laboratoires de microbiologie et de contrôle de l'industrie alimentaire, d'agences gouvernementales et de centres de recherches, avec celle d'une variante de la méthode d'Enrichissement au froid (EF) développée par le docteur Susan McCarthy du FDA.

On a analysé par les méthodes FDA et USDA un total de 96 échantillons de

crevette (80 artificiellement contaminés avec la souche ATCC 19115 et 16 non contaminés), puis, par la méthode EF, un total de 80 échantillons de crevette (64 artificiellement contaminés avec la souche ATCC 19115 et 16 non contaminés). Les échantillons contaminés ont été traités à  $-20^{\circ}\text{C}$ , à différentes doses: 0,0; 2,5; 3,5; 4,0 et 5,0 kGy. Le dénombrement des unités formatrices de colonies par gramme (ufc/g) avant traitement des échantillons volontairement contaminés se situaient entre  $6,0 \times 10^4$  et  $1,5 \times 10^5$ . À partir des échantillons contaminés puis traités à différentes doses, on a dépisté *L. monocytogenes* dans 53,8% d'entre eux à l'aide de la méthode FDA, dans 56,3% avec la méthode USDA et dans 60,3% avec la méthode EF. Seule la méthode EF s'est avérée assez sensible pour dépister la bactérie dans l'un des seize (6,25%) échantillons traités à 5,0 kGy.

Dans la méthode FDA et dans la méthode EF, la combinaison des milieux Listeria Enrichment Broth (LEB), Bouillon Fraser (BF) et Oxford ou Lithium Phenyléthanol Moxalactam (LPM), s'est montrée efficace, permettant d'isoler *L. monocytogenes* à partir d'échantillons dans lesquels on n'avait pas détecté la bactérie en employant la combinaison des milieux LEB et Oxford ou LPM. Finalement, on a constaté que les étapes d'enrichissement permettent aux cellules de *L. monocytogenes* plus au moins endommagées par le traitement ionisant, de récupérer et de former des colonies autant sur milieu Oxford que LPM.

Bref, nous avons montré que les populations des souches étudiées étaient largement réduites par l'ionisation, mais que la congélation ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) constitue un facteur

d'atténuation très important, faisant doubler la valeur de la DRD des souches, indépendamment de l'environnement dans lequel elles étaient distribuées. Concernant l'étude comparative des méthodes de dépistage de *L. monocytogenes*, les trois méthodes employées (FDA, USDA et EF) nous ont permis de récupérer la bactérie à partir d'échantillons de crevette aussi faiblement contaminés que 4,5 ufc/10 g (estimée par la technique du NPP).

## INTRODUCTION

L'augmentation des cas d'infection alimentaire causés par *Listeria monocytogenes* inquiète de plus en plus les organismes de contrôle de la santé et les industries alimentaires. Les fruits de mer tel que la crevette, sont de ces aliments qui subissent un grand nombre de manipulations, depuis leur capture jusqu'à l'assiette du consommateur. La crevette constitue un excellent substrat à la propagation de *L. monocytogenes* qui se divise aux températures de réfrigération et possède, selon quelques recherches, une thermorésistance plus importante que la plupart des pathogènes alimentaires. *L. monocytogenes* demeure à l'état latent dans l'intestin d'environ 9% de la population humaine. Elle a déjà été isolée de l'eau de mer, de la crevette et de surfaces de contact d'usines de transformation. Les fléaux occasionnés par *L. monocytogenes* se traduisent par un taux de mortalité aux alentours de 30%. Les femmes enceintes et leurs foetus ainsi que les personnes âgées et immunocompromises sont les victimes les plus durement touchées. Les caractéristiques épidémiologiques des listérioses sont mal comprises et la dose infectieuse minimale n'a pas encore été déterminée.

Au début des années 80, les flambées épidémiques qui ont frappé l'Amérique du Nord et l'Europe, puis la multiplication du nombre de cas isolés de listériose, ont fait courir les microbiologistes du monde entier à la quête de méthodes de dépistage de *Listeria monocytogenes* aussi efficaces, mais beaucoup plus rapides, que la méthode d'enrichissement au froid développée à la fin de la deuxième guerre mondiale (Gray et al., 1948). On a aussitôt établi des liens entre les listérioses et la consommation

d'aliments contaminés. Au Canada, la mise en service du réseau de surveillance en laboratoire sur la listériose humaine, qui avait été amorcée en 1987, n'a été complétée qu'en 1989 (Santé et Bien-être social Canada, 1989). L'année 1989 marque aussi l'ajout de la listériose à la liste des maladies à déclaration obligatoire (Santé et Bien-être social Canada, 1991).

Autrefois, la détection et l'isolement direct de ce germe pathogène des denrées alimentaires s'avéraient des tâches ardues. La majorité des bouillons de cultures et des milieux gélosés sélectifs développés étaient incapables de permettre la récupération et la croissance des cellules partiellement abîmées, souvent présentes dans les aliments transformés (Ryser et Marth, 1991). Il n'y a pas longtemps, des chercheurs américains ont réussi à mettre au point deux méthodes de dépistage de *L. monocytogenes*: la méthode FDA, utilisée pour isoler le germe des produits laitiers, des fruits, des légumes et des fruits de mer et la méthode USDA employée pour dépister ce pathogène des produits carnés. En Europe, on a développé la méthode IDF (International Dairy Federation), qui est une variante de la méthode FDA pour le lait et ses produits dérivés; la méthode COBAC, des Laboratoires COBAC de France, qui y est recommandée par le Laboratoire central d'hygiène alimentaire pour analyser des spécimens environnementaux et alimentaires; la méthode NGFIS (Netherlands Government Food Inspection Service) qui est utilisée pour les aliments en général (Ryser et Marth, 1991).

Partout dans le monde, on a comparé l'efficacité de ces méthodes sélectives, préconisées pour le dépistage de *L. monocytogenes* des aliments crus et transformés de



tout genre. Les résultats des ces travaux ajoutés à ceux réalisés au Canada, ont permis récemment aux chercheurs de la Direction Générale de la Protection de la Santé (Warburton et al., 1991) d'établir une seule méthode de dépistage de *Listeria* dans tous les types d'aliments et dans les échantillons prélevés de l'environnement. Cette méthode résulte de la fusion de deux protocoles, ceux du FDA et du USDA. Plusieurs travaux comparent l'efficacité des bouillons d'enrichissement et des milieux gélosés employés lors des étapes d'enrichissement sélectif et d'isolement. Également nombreux sont les travaux qui comparent l'efficacité des milieux gélosés utilisés pour récupérer les cellules stressées, présentes dans des denrées subissant au moins un traitement physique et/ou chimique et/ou biologique. Toutefois, un nombre limité de travaux compare l'efficacité des milieux gélosés et des méthodes de dépistage, pour la récupération des cellules de *L. monocytogenes* contaminant les aliments traités par l'ionisation.

À partir de ces constatations, un protocole de recherche a été élaboré afin de déterminer la radiorésistance de *L. monocytogenes* dans des environnements différents, tels une solution physiologique, le BTS-EL et la crevette homogénéisée et entière. Dans le BTS-EL, les souches ont été irradiées, tant en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance. L'expérience visant la détermination de la radiorésistance des souches contaminant la crevette et la solution physiologique fut faite à 0 et à -20°C. Le protocole se termine par l'étude comparative de l'efficacité de méthodes de dépistage de *L. monocytogenes*, présente dans la crevette, volontairement contaminée ( $10^4$  à  $10^6$  ufc/g) et traitée à différentes doses.

## 1 - REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1.1 PERSPECTIVE HISTORIQUE

Plusieurs auteurs rapportent que *Listeria monocytogenes* aurait déjà été observée bien avant qu'on l'identifie pour la première fois en 1926. (Cotoni, 1942; Gray et Killinger, 1966; Seeliger et Finger, 1983). Un petit bâtonnet Gram-positif fut isolé de tissus nécrosés de cobayes de laboratoire par une équipe de chercheurs de l'Université de Cambridge, lors d'une épidémie de listériose survenue en 1924 (Murray et al., 1926). Ceux-ci nommèrent ce germe *Bacterium monocytogenes* en raison de la production d'une intense mononucléose sanguine chez les cobayes. L'année suivante, en Afrique du Sud, Pirie isolait, du foie de gerbilles, un bacille Gram-positif qui provoquait la mort des rongeurs des steppes sud africaines. Pirie le nomme *Listerella hepatoholytica*, en hommage à un des pionniers de la bactériologie, le chirurgien anglais Joseph Lister (Pirie, 1927). Dans les années qui suivirent l'isolation et l'identification de la bactérie, plusieurs autres laboratoires produisirent d'autres informations sur les maladies et les symptômes des listérioses causées par la bactérie (Lovett, 1989). Lorsque plus tard, on a comparé ces informations et qu'on a établi l'identité commune de *Bacterium monocytogenes* et de *Listerella hepatoholytica*, Pirie, cité plus haut, a aussi suggéré que l'on adopte la nomenclature de *Listerella monocytogenes*. Cette appellation fut rejetée par le Comité de Nomenclature, car elle avait déjà été employée pour désigner un groupe de moisissures en 1906. C'est ainsi qu'en 1940 Pirie propose le nom de *Listeria monocytogenes*, qui a

été accepté en 1954 par le comité de nomenclature et inscrit dans la sixième édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Gray et Killinger, 1966).

Avant les années 1980, la plupart des recherches effectuées sur les listérioses provenaient du domaine vétérinaire (Lovett, 1989; Gray et Killinger, 1966). Aux États-Unis, le nom du professeur Gray est parmi ceux qui ont le plus contribué à l'avancement des connaissances sur les listérioses chez les animaux. En plus de bien caractériser les listérioses chez le mouton, Gray a développé la procédure d'enrichissement au froid pour l'isolement de *L. monocytogenes*, la technique de l'illumination oblique pour détecter la bactérie sur gélose et rendit compte de ses études sur la morphologie des colonies. En Europe, c'est au professeur Seeliger que l'on attribue les importantes découvertes dans le domaine des pathologies listérioses animales et humaines, ainsi que les études sérologiques et taxonomiques sur ce germe pathogène (Lovett, 1989).

*L. monocytogenes*, isolée d'abord chez le lapin, a été retrouvée chez plusieurs espèces animales (Gray et Killinger, 1966). Le premier rapport reliant *L. monocytogenes* au développement de la maladie chez l'humain est apparu au Danemark. Nyfeldt avait isolé de très petits bacilles chez les malades atteints de mononucléose infectieuse (Nyfeldt, 1929). Durant les années suivantes, on remarque, aux États-Unis et en Grande-Bretagne, l'apparition, chez l'homme, de plusieurs cas d'infection listérienne et de méningite, souvent mortelles (Cotoni, 1942).

Au Canada, depuis l'apparition du premier cas de listériose en 1951 (Soot, 1954), jusqu'à l'arrivée d'une importante épidémie listérienne survenue en Nouvelle-Écosse en

1981, l'incidence de la maladie était caractérisée par sa sporadicité et par l'absence de concentration des cas à un moment ou à un endroit particulier. Sauf l'importante poussée de listériose, dans laquelle on a incriminé du chou cru contaminé (Schlech et al., 1983), la possibilité qu'un aliment ait été une source de *Listeria monocytogenes* n'a jamais été évoquée au Canada. De 1983 à 1986, on a estimé le nombre de cas à 18 par année (0,7 par million d'habitants), avec un taux de létalité de 28%. Le bilan des cas recensés jusqu'en 1986 est de 381 (Farber et Losos, 1988). Au Canada, on enregistre des cas de listérioses durant toute l'année, mais on peut constater dans les rapports annuels de surveillance publiés en 1988 et en 1989 que le plus grand nombre de cas survient entre la fin de l'été et le mois de décembre (Santé et Bien-être social Canada, 1988/1989). Farber et Losos, cités précédemment, rapportent cependant que la majorité des cas de listériose au Canada ont lieu durant l'été.

Depuis l'année 1979, trois fléaux épidémiques causés par des souches virulentes de sérotype 4b ont frappé les États-Unis (voir 1.7.2.2). Dans chacune de ces épidémies, on a réussi à identifier au moins un aliment qui a servi à l'incubation et à la dispersion du pathogène.

En Nouvelle Zélande, en 1980, il y a eu une flambée de listériose causée par le sérotype 1b. Ce sérotype, plutôt rare, n'avait pas été inculpé dans les fléaux de listériose précédents. Malgré le manque de preuve formelle, ce sont les fruits de mer que l'on accuse dans cette affaire. Ils auraient causé la mort de 5 des 22 victimes (Lenonn et al., 1984). Environ 97% des souches isolées appartiennent à un des deux sérotypes, la

et 4b (Seeliger et Finger, 1983).

En 1988, lors d'une réunion d'urgence sur la listériose alimentaire qui a eu lieu à Genève, les autorités de l'Organisation Mondiale de la Santé ont insisté avec force pour que les chercheurs améliorent les techniques de détection de *Listeria monocytogenes* (OMS, 1988). Avant la mise au point des méthodes d'enrichissement sélectives, la méthode d'enrichissement au froid était la seule méthode disponible pour l'isolement de *Listeria* à partir d'environnements fortement contaminés comme les aliments (Gray et al., 1948). Des méthodes conventionnelles plus rapides, telles que celle du FDA (Lovett, 1988) et du USDA (McClain et Lee, 1988), sont des méthodes développées durant les années 80 afin de créer une technique rapide et fiable pour l'isolation de *Listeria*. Pour plus de détails concernant ces deux méthodes, voir Figure 2a.

## 1.2 CARACTÉRISATION DE *L. MONOCYTOGENES*

### 1.2.1 Taxonomie

Le développement des techniques en taxonomie numérique, chimique, d'hybridation ADN-ADN et ADN-ARN et plus récemment en séquençage de la fraction 16S de l'ARN ribosomale a contribué énormément à la compréhension et à la classification phylogénétique de la bactérie. Grâce à ces techniques, l'inventaire des espèces de *Listeria* a évolué rapidement après 1974. D'ailleurs, les expérimentations sur l'hybridation ADN/ADN réalisées par Stuart et Welshimer en 1973 suggéraient déjà que l'espèce *L. monocytogenes* était un groupe génomiquement hétérogène (Rocourt, 1989). Dans la huitième édition du manuel Bergey (Buchanan et Gibbons, 1974), on rapportait

seulement quatre espèces, *L. monocytogenes*, *L. denitrificans*, *L. murrayi* et *L. grayi*. Douze ans plus tard, dans la neuvième édition du manuel, on y rajoute quatre autres nouvelles espèces: *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* et *L. ivanovii* (Seeliger et Jones, 1986). En fait, aucune autre nouvelle espèce n'a été isolée depuis la publication de la huitième édition du manuel Bergey, seulement le remaniement des souches non-pathogènes classées auparavant comme *L. monocytogenes* (Lovett, 1989).

Déjà en 1974, on discutait de l'appartenance des espèces *L. denitrificans*, *L. murrayi* et *L. grayi* au genre *Listeria*. Les études d'hybridation ADN-ADN, de taxonomie numérique et sérologique réalisées par plusieurs groupes de recherche (Stuart et Welshimer, 1973; Stuart et Welshimer, 1974; Rocourt *et al.*, 1982) ont démontré de très fortes homologues entre *L. grayi* et *L. murrayi*. En raison de ceci, puis du fait que ces chercheurs aient trouvé un rapport moins étroit entre les deux souches et les autres espèces du genre *Listeria*, Stuart et Welshimer proposèrent, en 1974, la création d'un nouveau genre *Murraya*, qui aurait deux sous-espèces *Murraya grayi subsp. grayi* (*L. grayi*) et *Murraya grayi subsp. murrayi* (*L. murrayi*). Pour ce qui est du phénotype, *L. grayi* diffère de *L. murrayi* uniquement par son incapacité de réduire les nitrates. Ces deux dernières espèces diffèrent de *Listeria monocytogenes* "sensu lato" par les caractéristiques phénotypiques suivantes: réduction des nitrates, fermentation du mannitol, absence des enzymes phosphamidase et phosphatase acide, ainsi que par son incapacité de croître dans un milieu contenant de la tryptaflavine (Rocourt, 1989). Le nouveau genre *Murraya* n'est cependant pas encore reconnu (McLauchlin, 1987). D'un autre côté, des

études chimiques (parois cellulaires, cytochromes, métaquinone et acides gras) et de taxonomie numérique plus récentes, prônent le maintien des deux espèces *L. grayi* et *L. murrayi* dans le genre *Listeria* (Seeliger et Jones, 1986). Rocourt et ses collaborateurs arrivèrent à cette même conclusion lors d'une étude comparative de la composition de la fraction ribosomale 16S de l'ARN de *L. murrayi* et de *L. monocytogenes* (Rocourt et al., 1987a). Bref, pendant que des études plus poussées s'accumulent et se contredisent, on traite *L. grayi* et *L. murrayi* comme des espèces d'affiliation incertaine (Seeliger et Jones, 1986). *L. denitrificans* est une espèce comprenant une seule souche qui fut isolée en 1948 à partir de sang cuit de boeuf (Sohier et al., 1948). Dans la neuvième édition du manuel Bergey, on donne comme références une série de publications issues d'études sur la morphologie, les réactions biochimiques, la sérologie des antigènes somatiques et flagellaires, la composition chimique et les acides nucléiques qui démontrent que *L. denitrificans* n'appartient aucunement au genre *Listeria* (Seeliger et Jones, 1986). Rocourt et ses collaborateurs ont proposé la création du genre *Joanesia* pour y classer *L. denitrificans* (Rocourt et al., 1987b). Par leurs études comparatives, ils ont conclu que le peu de similarité entre le contenu de la fraction ribosomale 16S de l'ARN de *L. denitrificans* et ceux des autres *Listeria* justifie la création du nouveau genre. *L. denitrificans* appartient indéniablement à une ramification des bactéries corynéformes (formes bacillaires irrégulières et variables en taille, avec des formes massues et des arrangements en "V" ou en "Y" dues à une croissance angulaire par bourgeonnement polaire, subterminal) de la subdivision actinomycètes comprenant les *Actinomyces*,

*Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Stomatococcus*, *Promicomonospora* et les taxa qui y sont reliées (Espaze et al., 1986).

Rocourt et collaborateurs ont recherché un lien possible entre le pouvoir pathogène des souches chez la souris et la classification de ces souches en groupes génomiques. Les résultats montrent que les souches pathogènes et virulentes appartiennent aux groupes génomiques *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*. D'après Seeliger et Jones (1986) et McLauchlin (1987), les trois autres souches de *Listeria*, *L. innocua*, *L. welshimeri* et *L. seeligeri*, sont non-pathogènes et non-virulentes (voir tableau 1-II). Dans la littérature, on rapporte toutefois, que *L. seeligeri* fut impliquée dans un cas de méningite purulente chez un individu immunocompétent (Rocourt et al., 1986). *L. ivanovii* est rarement associée à la production de maladies chez l'humain. En Bulgarie, 10% des infections listérioses chez les animaux ont été attribuées à *L. ivanovii* (Ivanov et Massalaski, 1979). Les seules souches reconnues pathogènes pour l'homme sont celles regroupées dans l'espèce *L. monocytogenes*, "sensu stricto" (McLauchlin, 1987).

Dans la neuvième édition du manuel Bergey, les auteurs insistent sur la nécessité de vérifier l'activité hémolytique et le pouvoir pathogène pour la souris, pour les nouveaux isolats de *Listeria*, ceci en raison du degré élevé de similarité exprimé phénotypiquement par les souches de ce genre.

En 1966, *L. monocytogenes* était classée dans la famille des *Corynebacteriaceae*, de l'ordre des *Eubacteriales* (Gray et Killinger, 1966). La huitième édition du manuel Bergey (Buchanan et Gibbons, 1974) ne reconnaît pas l'appartenance de *Listeria* à la



famille *Corynebacteriaceae* et a présenté *Listeria* comme un genre d'affiliation incertaine. Des études supplémentaires s'avèrent encore nécessaires avant d'établir sa classification phylogénétique ainsi que son rapport avec d'autres genres.

Les genres avec lesquels *Listeria* est le plus souvent confondu sont les *Streptococcus* (groupe D), les *Brochothrix*, les *Erysipelothrix*, les *Lactobacillus* et les *Kurthia*. Cependant, *Kurthia* est aérobic strict et est incapable de fermenter le glucose. *Erysipelothrix* est catalase négative et ne présente pas de motilité. La plupart des lactobacilles ne présentent pas de mobilité et ne produisent pas de colonies ayant une iridescence gris bleuté sous condition de transillumination (McClain et Lee, 1988). Contrairement à *Listeria*, le psychrotrophe *Brochothrix thermosphacta* est incapable de croître à 37°C. Par contre, *Listeria* est incapable de pousser sur le milieu de Gardner, sélectif pour *Brochothrix thermosphacta*.

Les formes coccobacillaires du genre *Listeria* peuvent occasionnellement être confondues avec des streptocoques du groupe D, tel que le *Streptococcus faecium*. Ceux-ci sont des Gram-positifs normalement présents dans les excréments des mammifères et fréquemment dans les aliments. En appliquant le test de la catalase on peut résoudre ce problème (Seeliger et Jones, 1986).

D'autres chercheurs ont rajouté les genres *Caryophanon* et *Renibacterium*. Le premier des deux, qu'on retrouve dans l'intestin de la vache, est non-pathogène. Il est constitué de bacilles courts se regroupant en chaînettes et est aérobic strict. Le deuxième, le *Renibacterium* est un germe pathogène pour le poisson. Les formes de

bacilles courts s'arrangent souvent en paires, sont immobiles et le genre est aérobic strict (Seeliger et Jones, 1986; Renaud et Freney, 1988).

### 1.2.1.1 Sérotypie

D'après Lovett (1989), les études sérologiques de *L. monocytogenes* ont débuté avec Seastone, en 1935. Ce chercheur pensait que l'origine des souches isolées d'un spécimen infecté pouvait être déterminée par des tests sérologiques. Lovett nous apprend cependant, que les bases de l'actuel système de sérotypie furent établies par Paterson vers 1939. Depuis, les résultats de plusieurs travaux nous permettent d'affirmer que le sérotype est associé ni à l'espèce infectée, ni au processus de développement de la maladie, ni à l'origine géographique (Gray et Killinger, 1966). Les microbiologistes ont identifié des antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) qui leur permirent de définir les 13 sérotypes (sérovars) du genre *Listeria monocytogenes* connus aujourd'hui (McLauchlin, 1987). Les antigènes "O" et "H" de *Listeria* sont de nature protéique, contenant des fractions d'hydrates de carbone (Ryser et Marth, 1991). Les sérotypes 1/2a, 1/2b et 1/2c constituant le groupe 1/2, prédominent nettement dans les denrées destinées à la consommation humaine. Le sérotype 4b ne représente qu'un faible pourcentage, 5%. Dans un rapport annuel d'activité publié en 1987, Espaze a constaté que 62% des souches de *L. monocytogenes* isolées d'un spécimen humain étaient de sérotype 4b (Stahl, 1989). En Grande-Bretagne (1967-1985), on a effectué le sérotypage de 722 isolats cliniques de *L. monocytogenes*. Environ 90% des isolats appartenaient à un des trois sérotypes suivants, 1/2a, 1/2b et 4b; ce dernier représentant 59% des sérotypes classés. Bien que le

sérotypage sert à l'identification des isolats de *L. monocytogenes*, cette méthode est de valeur limitée du point de vue des études épidémiologiques, car une large majorité d'isolats cliniques humains et animaux de *L. monocytogenes* appartient à un petit nombre de sérotypes (Seeliger et Hohne, 1979; McLauchlin, 1987). L'emploi seul des antiséras disponibles dans le commerce (DIFCO Laboratories Inc., États-Unis) pour l'identification d'isolats de *Listeria monocytogenes* n'est pas recommandé, sans effectuer au préalable une caractérisation biochimique des isolats, car *Listeria monocytogenes* partage plusieurs antigènes somatiques et flagellaires avec d'autres *Listeria* spp. (Ryser et Marth, 1991).

Quelques sérotypes démontrent une réaction croisée avec des entérocoques, certaines souches de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus* et quelques corynébactéries mobiles (Seeliger et Hohne, 1979).

Les études d'hybridation ADN/ADN révèlent l'existence de cinq groupes génomiques. *L. murrayi* et *L. grayi* n'appartiennent à aucun de ces groupes. Le Tableau 1-I qui suit est une mise à jour de la distribution de sérotypes à l'intérieur du genre *Listeria*.

TABLEAU 1-I: Sérotypes de *Listeria* spp.

<i>Listeria</i> spp.	Sérotipe	Structure des antigènes		
		Somatiques (O)	Flagellaires (H)	
<i>L. monocytogenes</i> <sup>a</sup>	1/2a	I II (III) <sup>b</sup>	A B	
	1/2b	I II (III)	A B C	
	1/2c	I II (III)	B D	
	3a	II (III) IV	A B	
	3b	II (III) IV (XII) (XIII)	A B C	
	3c	II (III) IV (XII) (XIII)	B D	
	4a	(III) (V) VII IX	A B C	
	4ab	(III) V VI VII IX X	A B C	
	4b	(III) V VI	A B C	
	4c	(III) V VII	A B C	
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C	
	4e	(III) V VI (VIII) (IX)	A B C	
	7	(III) XII XIII	A B C	
	<i>L. ivanovii</i>	5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
	<i>L. innocua</i>	6a("4f")	(III) V (VI) (VII) (IX) XV	A B C
6b("4g") <sup>c</sup>		(III) (V) (VI) (VII) IX X XI	A B C	
<i>L. grayi</i>		(III) XII XIV [XVI] <sup>d</sup>	E	
<i>L. murrayi</i>		(III) XII XIV [XVII] <sup>d</sup>	E	

a- *L. seeligeri* ne diffère pas de *L. monocytogenes* du point de vu sérologique. b- ( ) = pas toujours présent. c- *L. welshimeri* ne diffère pas de *L. innocua* sérotipe 6b. d- [ ] = proposé en 1988 par J. Vasquez-Boland et collaborateurs (cités par Ryser et Marth, 1991). Source: (Ryser et Marth, 1991).

### 1.2.1.2 Lysotypie

Le succès de l'application du système de lysotypie pour d'autres bactéries telles que *Staphylococcus aureus*, a permis un développement rapide pour celui du système de *L. monocytogenes*. La lysotypie se réalise à l'aide d'un jeu de bactériophages et se base sur la lyse bactérienne, suite à une infection par un bactériophage hautement spécifique. La méthode, selon ses promoteurs, pouvait être utilisée dans certaines situations épidémiologiques, dans des investigations du domaine taxonomique et à chaque fois que l'on désirait utiliser un marqueur pour ces bactéries. Le Docteur Audurier, chef du Service de microbiologie à l'hôpital de Tours, en France, a développé, en 1977, une méthode de lysotypie pour *Listeria* (Audurier et al., 1977). En 1979, le Docteur Audurier et ses collaborateurs publièrent les résultats de la lysotypie de 823 souches de *L. monocytogenes* isolées en France entre 1958 et 1978. L'utilisation du jeu de 20 bactériophages leur a permis de caractériser 645 des 823 souches de *L. monocytogenes*, soit 78,4% de souches typables. Des souches typables appartenant au sérotype 4, on a réussi à en caractériser 88,0%, tandis que, seulement 57,7% des souches du sérotype ½ ont pu être identifiées à l'aide du jeu de phages (Audurier et al., 1979). On a utilisé ce même jeu de phage lors d'une étude épidémiologique en Angleterre, afin d'identifier les sérotypes des souches de la collection de la "Division of Microbiological Reagents and Quality Control". On a réussi à identifier 37% et 82% des souches appartenant aux sérotypes ½ et 4, respectivement (McLauchlin, 1987). Le faible pourcentage de souches de *L. monocytogenes* appartenant au sérotype ½, que cette méthode réussissait à

identifier, ainsi que les problèmes liés à la reproductibilité des lysotypes "in vitro", demandaient des améliorations à la méthode afin d'obtenir un jeu de phages, qui puissent être employés de manière routinière. En Europe, l'Institut Pasteur, depuis 1987, est devenu un centre international d'identification et/ou de sérotypage de *Listeria*. Avec les récents progrès dans ce domaine, la lysotypie devient un outil puissant qui pourrait être utilisé avec avantages lors des épidémies de listériose (Ryser et Marth, 1991).

### 1.2.2 Morphologie et coloration

*Listeria* est un bâtonnet Gram-positif aux extrémités arrondies (Murray et al., 1926). Ses dimensions varient entre 0,5 et 2,0  $\mu\text{m}$  de longueur et entre 0,4 et 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre (Pirie, 1927). Les bâtonnets sont souvent droits, toutefois des bacilles légèrement courbés ne sont pas rares. Murray et ses collaborateurs (1926) ont observé des bâtonnets en forme d'un demi-cercle. Dans les cultures liquides prédominaient des très petits bâtonnets semblables à des coques. Cependant, dans les cultures sur milieu solides cette forme ovoïde est plutôt rare. La forme ovoïde des jeunes bâtonnets de *Listeria* peut être confondue avec les chaînettes de streptocoques; le test de la catalase déjà mentionné sert à dissiper le doute (Seeliger et Jones, 1986). Des cellules filiformes, ayant une longueur dix à douze fois plus importante que la longueur ordinaire, peuvent être présentes (Pirie, 1927). Dans la neuvième édition du manuel Bergey, on rapporte l'apparition de ces filaments dans les cultures âgées ou préparées à partir de colonies rugueuses (Seeliger et Jones, 1986). Dans les cultures ou dans les tissus, les bâtonnets sont souvent en paires (diplobacilles), bout à bout, en ligne droite et moins fréquemment

en angle. Finalement, ils peuvent aussi se présenter en groupement palissades (Gray et Killinger, 1966). *Listeria* ne sporule pas et ne produit pas de capsule.

Les bâtonnets sont mobiles grâce à la présence d'un petit nombre de flagelles péritriches. La mobilité de *Listeria* est hautement dépendante de la température. Griffins et Robbins (cités par Gray et Killinger, 1966), en utilisant le colorant flagellaire de Gray, ont observé que 90% des cellules incubées à 37°C étaient non flagellées tandis que 80% des cellules incubées à la température ambiante possédaient des flagelles. En utilisant la technique de la goutte pendante ou du montage humide on peut observer, à travers un objectif à immersion d'un microscope à contraste de phase, les bâtonnets qui se déplacent en culbutes ou en mouvements de rotation suivis de brefs périodes de repos. Une autre façon de vérifier la mobilité consiste à ensemercer, par piqûre, le centre d'un milieu gélosé, à faible concentration de gélose, et de le laisser ensuite quelques jours à la température ambiante. *Listeria* est mobile et donne une croissance en parapluie (Seeliger et Jones, 1986). Dans les cultures de préparation récente, *Listeria* est invariablement Gram-positif. Cependant, dans une culture âgée, il peut arriver que *Listeria* s'affiche Gram-négatif (Gray et Killinger, 1966).

### 1.2.3 Exigence nutritionnelle

*L. monocytogenes* est un microorganisme non fastidieux qui peut être facilement cultivé dans les milieux de culture usuels: gélose tryptose, gélose nutritive, gélose sang, bouillon trypticase soya-extrait de levure (BTS-EL) ou gélose trypticase soya-extrait de levure (GTS-EL) (Seeliger et Jones, 1986; Lovett, 1989; Welshimer, 1981; Warburton et

Farber, 1990). Toutefois, les tentatives d'isolement de la bactérie à partir de spécimens cliniques, environnementaux ou alimentaires peuvent s'avérer une tâche ardue. Dans ces milieux, *L. monocytogenes* est souvent présente en faibles quantités, comparativement à une grande variété d'autres micro-organismes (Ryser et Marth, 1991). C'est pourquoi on fait appel à un enrichissement en milieux sélectifs liquides favorisant la multiplication de *Listeria* et inhibant celle des autres micro-organismes.

*Listeria* spp. croît bien dans un hydrolysat de gélatine ou de caséine contenant du glucose comme source de carbone. Dans un milieu pauvre en facteurs de croissance, l'ajout de sang et de sérum sanguin stimulent la multiplication de la bactérie. Les souches semblent avoir des besoins différents en vitamines du complexe B. Les acides aminés valine, leucine et isoleucine sont essentiels, mais le soufre organique peut être remplacé par la cystéine ou par le thioglycolate qui sert au même temps à réduire le potentiel redox. La présence de:  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  (en présence de riboflavine),  $Ca^{2+}$  et  $PO_3$  est nécessaire, tandis que le  $K^+$  stimule sa croissance (Gray et Killinger, 1966; Ryser et Marth, 1991).

La croissance optimale de *Listeria monocytogenes* a lieu entre 25 et 37°C, cependant, le taux maximum de croissance est atteint à partir de 30°C et se maintient jusqu'à 37°C. Puisque la grande majorité des espèces bactériennes est incapable de se reproduire à des températures de réfrigération, l'incubation prolongée (1 à 3 mois) d'échantillons cliniques, environnementaux ou alimentaires préalablement dilués dans un milieu non sélectif, se montre souvent une bonne façon de faire pour l'isolement de *L.*



*monocytogenes* (Ryser et Marth, 1991).

Dans des conditions optimales de transillumination, les colonies de *Listeria* les mieux isolées et les plus grosses (âgées de 24 heures) sur les milieux gélosés opaques, ressemblent à des tas blanchâtres de verre pilé comportant souvent des structures internes ressemblant à des mosaïques et présentant parfois une iridescence d'un bleu gris qui semble scintiller. Lorsque la croissance microbienne devient presque confluyente, on peut observer une iridescence bleu gris uniforme (Warburton et Farber, 1990). Le diamètre des colonies peut varier entre 0,3 et 1,5 mm, en fonction du nombre de colonies présentes sur le Petri. Elles ont aussi, après 24 heures d'incubation, une consistance aqueuse (Gray et Killinger, 1966). Une incubation prolongée fait augmenter le diamètre des colonies de 3 à 5 mm.

On rapporte que les repiquages fréquents de cultures peuvent occasionner la perte de virulence des souches. Les colonies lisses et arrondies produites par les souches virulentes deviennent rugueuses, de bordure ondulée, avec l'apparition de stries irradiant de la périphérie des colonies (Seeliger, 1961).

Les espèces hémolytiques du genre *Listeria* produisent une hémolysine, de nature protéique, qui est capable d'attaquer les érythrocytes de la majorité des mammifères. Dans les laboratoires on utilise principalement le sang de mouton et de cheval pour réaliser l'épreuve de l'hémolyse. L'hémolyse est plus prononcée chez les cultures fraîchement isolées et elle peut être absente chez les vieilles cultures de laboratoire (Gray et Killinger, 1966). Kleikamp (cité par Gray et Killinger, 1966) a constaté que les zones d'hémolyse

produites par les cultures incubées à 4°C sous une atmosphère riche en CO<sub>2</sub>, sont sensiblement plus prononcées que celles des cultures ayant été incubées à 20 et à 37°C. L'hémolyse du type bêta, produite par *L. monocytogenes*, se caractérise par l'apparition d'une légère zone claire qui s'étend rarement au-delà de la périphérie de la colonie après 24 heures d'incubation à 37°C (Seeliger, 1961; Gray et Killinger, 1966). Cette zone d'hémolyse peut être très faible, obligeant à enlever la colonie pour bien être vue; elle devient plus prononcée avec l'accroissement du temps d'incubation. Les souches de *L. ivanovii* typiques produisent des zones d'hémolyses beaucoup plus évidentes que celles produites par les souches de *L. monocytogenes*.

*L. monocytogenes* croît aussi bien en présence qu'en absence d'oxygène. Il a été rapporté récemment que les cellules ayant été stressées par la chaleur récupèrent en plus grand nombre lorsqu'on les cultive en anaérobiose (Farber, 1991b). Selon Seeliger, l'isolement de la bactérie est facilité lorsqu'on les incube à des niveaux de CO<sub>2</sub> plus élevés que ceux que l'on trouve dans l'air ambiant (Seeliger, 1961).

#### 1.2.4 Profil biochimique

*Listeria monocytogenes* est considérée relativement inactive du point de vue des réactions biochimiques (Seeliger et Finger, 1983). Un nombre réduit d'hydrates de carbone est fermenté avec production d'acide, mais sans production de gaz. Les *Listeria spp.* fermentent le glucose produisant principalement l'acide lactique L (+) (Seeliger et Jones, 1986). Cette bactérie hydrolyse ni la gélatine, ni la caséine, ni le lait (Ryser et Marth, 1991). Dans le Tableau 1-II, plus bas, on a résumé les principaux traits

biochimiques qui permettent de différencier les espèces classées dans le genre *Listeria*.

TABLEAU 1-II: Diagnostic différentiel des espèces du genre *Listeria*

Traits biochimiques	Souche	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria murrayi</i>
Groupe génomique		1	2	3	4	5	Hg*	Hg
Hémolyse bêta		+ <sup>a</sup>	+ <sup>b</sup>	-	-	+	-	-
Test de CAMP <i>Staphylococcus aureus</i>		+ <sup>c</sup>	-	-	-	+	-	-
Test de CAMP <i>Rhodococcus equi</i>		-	+	-	-	-	-	-
D-xylose <sup>d</sup>		-	+	-	+	+	-	-
L-rhamnose <sup>e</sup>		+	-	√ <sup>f</sup>	v	-	-	v
α-Méthyl-D-mannoside		+	-	+	+	- <sup>g</sup>	?	?
Mannitol		-	-	-	-	-	+	+
Réduction NO <sub>2</sub> → NO <sub>3</sub>		-	-	-	?	?	+	-
Pouvoir pathogène pour la souris		+	+	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer		+	+	+	+	+	+	+

Sources: (Seeliger et Jones, 1986; McLaughlin, 1987; Stahl, 1989)

Légendes:

a) Quelques souches de *Listeria monocytogenes* ne sont pas bêta hémolytiques.

b) Les souches de *Listeria ivanovii* produisent généralement des zones d'hémolyse prononcées.

c) La souche typique ATCC 15313 ne produit pas d'hémolyse dans le sang de cheval, de mouton et de boeuf.

d) Le milieu change de couleur entre le premier et le quatrième jour de fermentation (Stahl, 1989).

e) Le milieu change de couleur entre le deuxième et le sixième jour de fermentation (Seeliger et Jones, 1986).

f) Le résultat peut varier selon la souche.

g) Une souche testée sur dix a donné une réaction positive, selon Rocourt et Grimont (cités par Seeliger et Jones, 1986).

\* Hors groupe.

### 1.3 CROISSANCE ET SURVIE DE *L. MONOCYTOGENES*

L'omniprésence de *Listeria monocytogenes* dans la nature, sa capacité de survivre longtemps dans des conditions adverses et son habilité de croître à des températures aussi basses que 4°C font de cette bactérie un germe pathogène alimentaire d'importance indubitable. D'ailleurs, dans le secteur alimentaire, les fabricants, les restaurateurs, les détaillants, les agences gouvernementales, les média et les consommateurs, en général, sont de plus en plus sensibilisés à cette bactérie.

*Listeria monocytogenes* possède une gamme de températures de croissance très large, la limite inférieure se situe près de 0,0°C et la limite supérieure proche de 50°C (Feresu et Jones, 1988). Son temps de génération dans le bouillon de poulet à -4°C est de 62 heures, alors qu'il est de 131 heures dans le lait pasteurisé à -1°C (Walker et Stringer, 1987; Lovett, 1989). La capacité de cette bactérie de croître à des températures aussi basses que les températures de réfrigération préoccupe l'industrie alimentaire en général. Ce micro-organisme résiste à la congélation et à la décongélation répétées (Bryan, 1969). Le temps de génération de *L. monocytogenes* dans une infusion coeur-cerveille (ICC) fut déterminé à différentes températures: 35, 30, 25, 20, 15, 10 et 4°C. Les temps de génération ont été respectivement de 33, 44, 57, 72, 138, 270 minutes et 16,8 heures pour les cultures incubées sous aérobose et de 32, 39, 58½, 96, 150, 342 minutes et 15,6 heures, respectivement, pour les cultures incubées sous micro-aérobose (Kato, 1989). Petran et Zottola (1989) ont obtenu un temps de génération de 44 minutes, pour une autre souche cultivée dans le bouillon trypticase soya,

gardé à 30°C sous aérobiose et à pH 7,0. Lovett et ses collaborateurs (1988) ont examiné la croissance de *L. monocytogenes* chez la crevette préstérilisée, puis contaminée volontairement avec  $10^3$  ufc/g et incubée durant 2 semaines à 7°C. Après 1 semaine, la population de *L. monocytogenes* avait augmentée de 3 cycles logarithmiques; le temps de génération fut donc de 12 heures. Dans ses études menées à 4°C sur la cinétique de croissance de *L. monocytogenes*, Farber a observé que le germe s'est multiplié plus lentement dans la crevette contaminée naturellement qu'artificiellement (Farber, 1991a). Toutefois, on peut constater que le niveau de contamination du départ était environ cent fois plus élevé dans les échantillons de crevette contaminée artificiellement.

Il est possible que le stockage au froid (4°C) augmente la virulence de certaines souches de *L. monocytogenes* isolées de denrées alimentaires réfrigérées (Ryser et Marth, 1991). Durst, cité par ces derniers, a constaté que 7 parmi 36 souches présentant une faible virulence pour la souris sont devenues plus virulentes à la fin d'une période d'entreposage de 6 mois à 4°C.

Dans une étude simulée, on a réussi à récupérer la bactérie à partir d'échantillons de saucisse frankfurter qui avaient été trempées dans un bouillon contenant  $10^6$  ufc/mL de *L. monocytogenes*, puis séchées et chauffées à environ 87°C durant 8 minutes. Plusieurs études parlent de l'habilité de *L. monocytogenes* de survivre aux traitements de chaleur; le Tableau 1-III présente les résultats de quelques expériences sur ce sujet.

Tableau 1-III: Thermorésistance de *L. monocytogenes* dans les aliments

Produit	ustensile	Température (°C)	Temps de Survie	Inoculum (ufc/g)
Boulettes de viande	gril	85	15 min	1x10 <sup>4</sup>
Lait	éprouvette	61,7	35 min	5x10 <sup>4</sup>
Lait	éprouvette	63	5 min	5x10 <sup>4</sup>
Lait	erlenmeyer	62,8	30 min	2,5x10 <sup>5</sup>
Lait	erlenmeyer	72	60 s	3x10 <sup>7</sup>
Caillé	cuve	57,2	30 min	1x10 <sup>5</sup>

Source: traduit de Lovett, 1989.

En ce qui concerne la thermorésistance de *L. monocytogenes* dans le lait pasteurisé, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a conclu, dans son rapport sur les listérioses d'origine alimentaire issu en février 1988, que "la pasteurisation telle que définie par le "Code of Hygienic Practice for Dried Milk - CAC/RCP 31-1983" est un procédé qui ramène le nombre de *L. monocytogenes* du lait à des niveaux qui ne comportent plus de risques pour la santé humaine" et que d'autres recherches n'étaient pas nécessaires à propos de la pasteurisation du lait, mais qu'elles l'étaient encore, en ce qui concerne la thermorésistance de *L. monocytogenes* dans d'autres denrées alimentaires comme les produits carnés. Toutefois, les produits laitiers peuvent être recontaminés par l'environnement après pasteurisation. Ceci n'est pas vrai seulement pour les produits laitiers, mais aussi pour la plupart des denrées alimentaires. (OMS, 1988).

Chez la crevette volontairement contaminée avec 10<sup>5</sup> ufc/g de la souche FDA-1A1 de *L. monocytogenes*, on a réussi à récupérer la bactérie d'échantillons qui avaient été bouillis pendant 5 minutes (McCarthy *et al.*, 1990)

La congélation en général n'affecte que peu *L. monocytogenes*. Seeliger et ses collaborateurs (cités par Hof et al., 1986) ont observé une réduction de 0,3 cycle logarithmique de la population bactérienne cultivée dans un bouillon tryptose-phosphate, puis congelée pour 3 semaines.

La gamme de pH permettant la croissance de *Listeria monocytogenes* est très large (5,0 à 9,6)(Lovett et Twedt, 1988), mais les taux de croissance maxima ont lieu à des valeurs de pH proches de 7,0 ou quelque peu plus élevées (Petran et Zottola, 1989). Un travail récent montre que *L. monocytogenes* est capable de se multiplier dans des milieux riches, privés d'agents bactéricides tel l'acide lactique, dont le pH est relativement bas. De fait, la bactérie s'est multipliée à un pH de 4,4 à 30°C ou 5,2 à 4°C dans le bouillon TSB enrichi et acidifié avec HCl (George et al., 1988). Lang et ses collaborateurs (cités par Ryser et Marth, 1991) n'ont pas observé de croissance après 2 jours d'incubation de *L. monocytogenes* à 13°C dans un bouillon TSB à pH 5,0, toutefois, 21 jours plus tard la population était de l'ordre de 10<sup>9</sup> ufc/mL.

La limite inférieure de pH d'un milieu dans lequel les *Listeria spp.* sont capables de se diviser peut être inférieure à 5,0, à la condition que la bactérie soit incubée à des températures proches de la température optimale et que l'on incube assez longtemps pour qu'elle puisse s'y adapter (Ryser et Marth, 1991).

On s'attend à ce que le pH minimal de croissance de *L. monocytogenes* soit donc fortement influencé par la température. Ryser et Marth (1991) ajoutent que l'activité anti-listérienne des acidifiants dépend à la fois du type et de la concentration de l'acide, et non



seulement de la valeur du pH. Sorrels et collaborateurs (1989) ont réalisé une étude sur les effets du pH, de l'acidifiant, du temps et de la température sur la croissance et la survie de *L. monocytogenes* cultivée dans le bouillon TSB acidifié. Les valeurs de pH variant entre 4,4 et 5,2 étaient ajustées avec différents acides: acide chlorhydrique, acide acétique, acide lactique, acide malique et acide citrique. Basé sur la valeur moyenne des pH des bouillons dans lesquels il y a eu croissance de *L. monocytogenes* cultivée à 10, 20 et 35°C, l'acide acétique fut le plus inhibiteur (pH 5,04), suivi par l'acide lactique (pH 4,73), puis l'acide citrique (pH 4,53), et finalement l'acide malique et chlorhydrique (pH 4,46). En ce qui concerne la température d'incubation, plus elle est élevée, moins longue est la survie de la bactérie cultivée dans des milieux à pH acide. La croissance de *L. monocytogenes* à des pH inférieurs à 4,3 n'est pas encore rapporté dans la littérature. Toutefois, on a réussi à récupérer la bactérie après 21 jours d'incubation à 4°C à partir du jus d'orange contaminé artificiellement avec  $10^6$  ufc/mL dont le pH avait été ajusté à 3,6 (Parish et Higgins, 1989).

Il y a peu d'information sur les limites d'activité de l'eau ( $a_w$ ) qui permettent la croissance de *L. monocytogenes*. Dans une étude, on a démontré que la population de *L. monocytogenes* a augmenté de plus de 3 cycles logarithmiques dans un bouillon TSB renfermant 39,4% de sucrose ( $a_w$  de 0,92), la variation de pH fut cependant minimale, de 6,8 à 6,5 (Petran et Zottola, 1989). D'autres chercheurs ont observé que sous conditions optimales, la bactérie peut se multiplier en présence de 10% de NaCl; ce qui équivaut à une valeur de  $a_w$  de 0,953 . De plus, la bactérie a pu survivre durant 1 an dans un

bouillon contenant 16% de NaCl à pH 6,0 (Seeliger, 1961). Cependant, une étude avec du jus de chou a révélé que *L. monocytogenes* ne s'est pas multipliée à des concentrations supérieures à 2% de NaCl (Conner et al., 1986). George et ses collaborateurs (1988) pensent que le jus de chou n'est pas assez riche pour permettre une bonne croissance du germe. Les résultats de Johnson et ses collaborateurs (1988) intéressent de près l'industrie de la transformation des viandes. Ces chercheurs ont constaté que le germe a survécu durant 84 jours dans un genre de salami fermenté ( $a_w$  entre 0,79 et 0,86) gardé à 4°C, malgré le faible pH de 4,3 à 4,5, une concentration relativement élevée de NaCl de 5,0 à 7,8% et 156 ppm de nitrite de sodium. Les auteurs ont extrapolé en disant que le germe peut survivre encore plus longtemps dans ce genre de produit qui le plus souvent possède une valeur de  $a_w$  d'environ 0,91. En fait, *Listeria monocytogenes* n'est pas inhibée par les taux de nitrite autorisés dans les aliments à moins qu'il y ait une interaction entre ces derniers et un autre additif tel le NaCl (Shahaman et al., 1980).

Gray a révisé les caractéristiques de survie de *L. monocytogenes* sous l'influence de différents environnements. Le micro-organisme survit plus de 3 mois dans l'ensilage et plus de 6 mois dans la paille sèche. La survie de *L. monocytogenes* dans les selles d'animaux contaminées artificiellement peut varier de 1 à 18 mois selon l'humidité du matériel (Gray, 1963).

*Listeria* est relativement résistante au séchage. Les taux de survie augmentent avec la réduction de la température (Welshimer, 1960).

Nous trouvons dans le volume de Ryser et Marth (1991) une vaste liste d'additifs, de détergents et/ou désinfectants présentant des propriétés anti-listériennes et qui sont utilisés dans l'industrie alimentaire. *L. monocytogenes* est plus fortement inhibée par le benzoate de sodium que par le sorbate de potassium. Le pH et la température jouent un rôle important dans l'efficacité des ces additifs. Lorsque le pH s'approche de la neutralité et que la température est favorable, *Listeria* supporte de plus fortes concentrations d'additif. Les antioxydants "BHA", "BHT" et propyl galate utilisés par l'industrie alimentaire afin de prévenir l'oxydation des matières grasses ont aussi un certain pouvoir anti-*Listeria*. Ryser et Marth nous apprennent également que les concentrations de "fumée liquide" nécessaires pour inhiber *L. monocytogenes* dans les produits charcutiers sont au-dessus des quantités organoleptiquement acceptables. Certaines épices comme l'origan et le clou de girofle présentent un pouvoir bactériostatique pour *L. monocytogenes*.

Les composés chlorés ainsi que les détergents à base d'iode démontrent un pouvoir listéricide très élevé (Ryser et Marth, 1991).

Les bactériocines, antibiotiques naturels, produites par des bactéries lactiques ont un pouvoir bactériostatique et bactéricide sur *L. monocytogenes* (Pucci et al., 1988). N'étant pas encore permise au Canada, l'utilisation de la nisine l'est déjà aux États-unis et en Europe. Aux États-Unis, il est permis d'utiliser une souche de *Streptococcus lactis* productrice de nisine dans la production de certains produits laitiers (Ryser et Marth, 1991). L'emploi d'enzymes naturelles, telles que la lysozyme, pour stopper la croissance de bactéries Gram-positif comme *L. monocytogenes* dans les produits d'origine animal fait

aussi l'objet d'études (Hughey *et al.*, 1989). Cette enzyme inhibe la croissance de la bactérie principalement lorsqu'on l'incube à des températures de réfrigération.

## 1.4 LISTÉRIOSES

### 1.4.1 Écologie et épidémiologie

*Listeria monocytogenes* possède les caractéristiques d'une bactérie tellurique. Malgré l'absence de spore, ses capacités de résistance dans le milieu extérieur sont remarquables. Cette bactérie peut être isolée d'une grande variété de sources, comme l'ensilage de mauvaise qualité, les déchets agricoles, le sol, les eaux d'égouts, les eaux de vidange d'abattoirs, les cours d'eau, l'eau de mer, le lait de vaches saines ou atteintes de mammite et les selles de personnes en santé. De plus, le micro-organisme a été isolé d'au moins 37 espèces de mammifères, de 17 espèces de volailles, d'oiseaux, de poissons et de crustacés (Gray et Killinger, 1966; Dillon et Patel, 1992).

Les sources de contamination de l'homme sont multiples mais elles sont le plus souvent d'origine alimentaire. Ce n'est qu'au début des années 80 que ce lien fut définitivement établi. La reconnaissance de l'implication de *L. monocytogenes* fut possible à partir des rapports épidémiologiques de listérioses humaines survenues en Amérique du Nord et en Europe. Mais, il n'existe que très peu d'exemples où la liaison aliment-listériose est prouvée.

Une fois le lien établi, le "Council of State Territorial Epidemiologists" recommande en 1986, que les listérioses soient des maladies à déclaration obligatoire aux

États-Unis (Gellin et Broome cités par Dillon et Patel, 1992).

#### **1.4.2 Pathologies animales et humaines**

##### **1.4.2.1 Pathologies animales**

Les formes cliniques classiques chez l'animal sont: la méningo-encéphalite, l'avortement, la mortinatalité et la naissance de nouveaux-nés infectés. La septicémie est plus rare. Les porteurs sains sont relativement fréquents; 10% des animaux sont porteurs sains de *L. monocytogenes*. Les espèces les plus touchées sont les ovins et les caprins, suivent les bovins, les équins, les poissons et les oiseaux. La maladie sévit à l'état endémique chez tous les animaux.

##### **1.4.2.2 Pathologies humaines**

Avant de rentrer dans le sujet proprement dit, on pense qu'il est important de préciser sur les principaux sérotypes responsables des listérioses humaines ainsi que de la notion de leur distribution géographique. On sait que la plupart des cas de listériose humaine sont causés par les sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b (Gellin et Broome, 1989). Il semble toutefois exister certaines différences géographiques dans la distribution des ces trois sérotypes. Par exemple, aux États-Unis, la distribution des sérotypes 1/2a, 1/2b et 4b est relativement égale (Bibb et al., 1990), tandis qu'en Grande-Bretagne, le sérotype 4b est prédominant (McLauchlin et al., 1986). Au Canada, la plupart des cas de listériose humaine sont reliés aux sérotypes 1/2 et 4b, le premier étant légèrement plus fréquent (Santé et Bien-être social Canada, 1991). Toutefois, l'analyse enzymo-électrophorétique

des isolats obtenus au Canada en 1989 montre que les cas de listériose sont pour la plupart causés par une population hétérogène de *Listeria monocytogenes*.

Certaines personnes sont plus sensibles aux infections à *Listeria*: les femmes enceintes et leur fœtus, les nouveaux-nés, les sujets atteints d'une affection telle une tumeur maligne, les personnes immunodéprimées, les alcooliques, les sujets atteints d'une maladie du foie, ceux qui prennent des corticostéroïdes et ceux qui subissent une hémodialyse à long terme (Nieman et Lorber, 1980). La listériose néonatale, qui se manifeste au cours de la grossesse et/ou chez le nouveau-né, constitue le plus important groupe d'infections reconnues dues à *Listeria monocytogenes*.

Les principales manifestations de cette maladie chez les humains comprennent la méningite, l'avortement spontané et la septicémie. On remarque d'autres formes peu fréquentes: péritonite, formation locale d'abcès, endocardite, urétrite, endophtalmie, conjonctivite et lésions cutanées (Nieman et Lorber, 1980; Ryser et Marth, 1991).

Les femmes enceintes atteintes de listériose présentent une affection bénigne rappelant la grippe. Toutefois, si le fœtus est infecté au cours du premier trimestre, il y a habituellement avortement spontané. Une infection à un stade plus avancé de la grossesse produira la mort ou un nouveau-né gravement malade. La majorité des infections chez les humains sont probablement asymptomatiques, l'organisme étant hébergé dans le vagin, le col de l'utérus ou l'intestin. Jusqu'à 9% de la population humaine peu l'héberger dans l'intestin sans nécessairement développer la maladie (Ryser et Marth, 1991).

Au cours des dernières années, on a signalé plusieurs épidémies de listériose en Amérique du Nord. En 1979, à Boston, des légumes (laitue, céleri et tomate) ont été les véhicules de transmission de *Listeria monocytogenes* qui a fait 23 victimes dont 5 morts. En 1981, en Nouvelle-Écosse, une épidémie de listériose a causé 18 décès sur un total de 41 cas. Une salade de choux hébergeait une souche ayant le même sérotype que celui isolé chez les victimes. Le chou utilisé dans la salade avait été cultivé dans des champs fertilisés au compost et/ou fumier brut produits par un troupeau de moutons qui avaient déjà présenté une listériose ovine (Schlech *et al.*, 1983). La troisième épidémie en Amérique du Nord survient en 1983 dans l'État du Massachusetts. Quatorze des 49 victimes meurent. Cette fois-là, c'est le lait pasteurisé qui fut impliqué dans la transmission de la maladie (Fleming *et al.*, 1984). La plus grande épidémie de listériose a eu lieu dans le sud de la Californie en 1985. Elle fit 105 morts sur 314 victimes. Un fromage de style mexicain fut incriminé dans cet épisode. Dans les quatre épidémies ci-haut mentionnées, un même sérotype, le sérotype 4b, a été incriminé. En Suisse, un fromage à pâte molle fut incriminé comme étant le véhicule de transmission de *L. monocytogenes* (Bille, 1988).

En dépit d'un nombre considérable de travaux, le pouvoir pathogène de *Listeria monocytogenes* et l'épidémiologie de la listériose restaient mal connus jusqu'à récemment. Mais depuis, le mécanisme de la virulence a été élucidé par une équipe de chercheurs de l'hôpital Necker et de l'Institut Pasteur (Stahl, 1989).

La porte d'entrée de l'infection est le rhino-pharynx ou le tube digestif (aliments

contaminés). Les bactéries entrent dans les entérocytes, qui tapissent l'intestin, et s'y multiplient. Après avoir traversé la barrière intestinale, les bactéries sont phagocytées par des macrophages riches en lysosomes. À l'intérieur de la vacuole se crée alors des conditions défavorables à la multiplication de *L. monocytogenes* qui produira, cependant, de la listériolysine. Cette enzyme attaque et détruit la membrane des macrophages; ce qui lui permet de se retrouver dans le cytoplasme où elle peut à nouveau se multiplier. La cellule est détruite par ses propres enzymes libérées et la bactérie, par la voie hématogène, se rend dans le foie, la rate, le cerveau et dans le fœtus (cas d'une femme enceinte). Normalement, quelques jours après une primo-infection ou lors d'une réinfection, nos défenses immunitaires réagissent: les lymphocytes T, en sécrétant les lymphokines, activent les macrophages. Le nombre de lysosomes est alors beaucoup plus important, ce qui entraîne la mort immédiate des bactéries. Mais chez les immunodéprimés et les fœtus, cette réaction est inexistante.

## 1.5 MÉTHODES DE DÉPISTAGE DE *LISTERIA* SPP. DANS LES ALIMENTS

La recherche de *Listeria monocytogenes* dans les aliments se réalise le plus souvent à l'aide de méthodes bactériologiques classiques. Les méthodes les plus utilisées en Amérique du Nord sont celles des agences américaines FDA et USDA. Pour plus de détails voir la Figure 2a. La première est utilisée surtout pour repérer *L. monocytogenes* des produits laitiers, des produits marins, des végétaux et de l'environnement. La méthode mise au point au USDA est celle employée le plus couramment pour dépister le



pathogène des produits carnés. Au Canada, tout récemment, après plusieurs études, on a fusionné les anciennes procédures de laboratoire appelées MFLP-59 et MFLP-60, dérivées des méthodes FDA et USDA, respectivement, et le dépistage de *L. monocytogenes* se fait désormais à l'aide d'une seule méthode, MFHPB-30 (Warburton *et al.*, 1992).

Les *Listeria* spp. ne sont généralement présentes qu'en faible nombre (moins de  $10^2$  ufc/g ou mL) dans les aliments (Rorvik et Yndestad, 1991; Johnson *et al.*, 1990; Grau et Vanderlinde, 1992). C'est pourquoi on fait appel à un enrichissement en milieux sélectifs liquides, favorisant la multiplication de *L. monocytogenes* et inhibant celle des autres micro-organismes.

Lorsqu'on veut dépister *L. monocytogenes* par des méthodes bactériologiques, il faut tout d'abord obtenir des cultures pures permettant l'identification précise du germe. Trois phases sont alors essentielles: l'enrichissement, l'isolement et l'identification des colonies de *Listeria*.

Quand il existe un intérêt épidémiologique majeur, la recherche peut se poursuivre jusqu'à la détermination du sérotype et du lysotype.

### **1.5.1 Méthodes conventionnelles de dépistage**

#### **1.5.1.1 Plan d'échantillonnage**

Au Canada, le Service de l'Inspection du Ministère Pêches et Océans élabore les lignes directrices d'analyses bactériologiques pour le poisson et les produits de la pêche.

Lorsque ceux-ci sont cuits, Pêche et Océans Canada exige que 5 échantillons de 10 grammes de chaque lot soient analysés pour le dépistage de *L. monocytogenes*. Aucune *L. monocytogenes* ne doit être retrouvée dans les unités analytiques de 10 grammes ou dans un mélange de 50 grammes pour que le produit soit accepté.

Harwig et ses collègues présentent les lignes directrices et le programme de contrôle de *L. monocytogenes* dans les aliments analysés par Santé et Bien-être social Canada (Harwig et al., 1991). Le plan d'échantillonnage prévoit 5 échantillons de 100 grammes ou mL chacun, pris au hasard selon les tables de randomisation des lots à être analysés. La sévérité du risque associé à un aliment donné détermine la taille des unités analytiques qui s'échelonnent entre 25 g (ou mL) pour les denrées que comme les produits laitiers permettent une bonne croissance du germe et 5 g pour les produits moins favorables à sa croissance. L'absence du germe dans chaque unité analytique ou dans le composite ne veut donc pas dire que celui-ci n'est pas présent dans un lot, mais qu'il n'existe qu'une faible possibilité que sa présence représente une menace à la santé publique.

#### **1.5.1.2 Enrichissement**

Deux techniques sont utilisées, chacune prise séparément ou en association. Elles sont l'enrichissement au froid et l'enrichissement sélectif "au chaud".

##### **1.5.1.2.1 Enrichissement au froid**

Les unités analytiques sont placées en milieux liquides non sélectifs tels que l'eau peptonée, le bouillon nutritif, le BTS-EL, le bouillon coeur-cervelle, etc... Elles sont ensuite gardées à 4°C pendant quelques jours, semaines ou même jusqu'à six mois. À

cette température, on privilégie *Listeria monocytogenes* qui se multiplie lentement alors que la flore compétitrice est inhibée.

Cette méthode a été proposée en 1966 pour l'isolement de *L. monocytogenes* des aliments et de l'environnement. Après l'étape d'enrichissement dans un bouillon nutritif gardé à 4°C durant plusieurs semaines, on transférait une aliquote sur des milieux sélectifs que l'on incubait à 35°C pour observation ultérieure.

McCarthy et ses collaborateurs (1990) ont proposé une version rapide de la méthode d'enrichissement au froid (EF) pour récupérer *L. monocytogenes* abîmée par la chaleur chez la crevette. Leur méthode consiste en une étape d'enrichissement au froid sans bouillon nutritif. Ils ont tout simplement entreposé, à 4°C durant 3 jours, les échantillons de crevette contaminée laquelle avait été bouillie entre 1 et 5 minutes. Après ces 3 jours, ils ont suivi la procédure FDA. Le tableau ci-dessous résume les résultats de la comparaison de leur méthode à celles du FDA et du USDA.

TABLEAU 1-IV:

Récupération de *L. monocytogenes* stressée par la chaleur à partir de la crevette artificiellement contaminée.

Méthode	Temps d'ébullition (min)			
	0	1	3	5
FDA	13/13 <sup>a</sup>	7/8	2/13 <sup>b</sup>	1/8 <sup>b</sup>
USDA	13/13	7/8	1/13 <sup>b</sup>	1/8 <sup>b</sup>
EF	13/13	8/8	13/13 <sup>c</sup>	8/8 <sup>c</sup>

a Nombre d'échantillons positifs/échantillons testés

b,c Les résultats dans une même colonne sont significativement différents selon le test chi-carré de McNemar ( $P < 0.05$ ).

Source: McCarthy *et al.*, 1990

Quoique l'on favorise la multiplication de *L. monocytogenes* à une température de réfrigération, d'autres micro-organismes tels les *Proteus*, les *Hafnia*, les *Pseudomonas*, les entérocoques et certaines bactéries lactiques peuvent également se multiplier. Ceci rend difficile l'isolement de *L. monocytogenes* par des milieux non sélectifs (Bojsen-Møller, J., 1972). C'est pourquoi on a pensé à l'ajout d'agents chimiques (Annexe III) afin d'inhiber la croissance de la flore compétitrice. L'enrichissement au froid n'est pas nécessairement la première étape, car il peut être employé comme enrichissement secondaire après un pré-enrichissement au chaud.

#### 1.5.1.2.2 Enrichissement sélectif au "chaud"

L'enrichissement au chaud a pour principe l'inhibition de la flore indigène grâce à l'ajout d'agents chimiques qui n'empêchent pas la croissance de *L. monocytogenes*.

Gray et ses collaborateurs (cités par Gray et Killinger, 1966) ont préconisé l'ajout de tellurite de potassium dans les formulations des milieux sélectifs destinés à l'isolement de *L. monocytogenes* et à l'inhibition de la flore compétitrice. En fouillant l'excellente revue bibliographique effectuée par Gray et Killinger (1966) sur *L. monocytogenes* et les infections listérioses, on y retrouve une série d'agents chimiques que l'on avait proposé à cette fin dès le début de la recherche sur le développement de milieux sélectifs pour *L. monocytogenes*. Ce sont la guanofuracine, la furacine, le chlorure de sodium, la glycine et le chloramphénicol. L'emploi de phényléthanol et de chlorure de lithium, proposé par McBride et Girard (cités par Ryser et Marth, 1991), s'est avéré très positif et ils faisaient partie de la composition de la gélose McBride employée jusqu'à la fin des années 80 par la méthode FDA. Ces deux agents chimiques sont efficaces pour l'inhibition de la flore bactérienne Gram-négatif et Gram-positif autre que *Listeria*. D'autres produits chimiques sont apparus, tel le cycloheximide qui a une propriété anti-fongique, l'acide nalidixique qui inhibe la flore Gram-négatif indigène, la tryptaflavine qui, employée avec l'acide nalidixique, prévient la croissance des coques Gram-positif, l'hydrochlorure d'acriflavine qui, en combinaison avec l'acide nalidixique, prévient la croissance de plusieurs bactéries Gram-positif, Gram-négatif et des streptocoques fécaux, l'antibiotique Polymyxin B qui, ajouté à l'acide nalidixique, inhibe la croissance de la flore compétitrice présente dans les

selles y compris les *Streptococcus faecalis*. L'acridine, le propolis, le ceftazidime, le rivanol, le moxalactame et la céphalosporine sont aussi des agents chimiques utilisés pour favoriser la croissance de *L. monocytogenes* et gêner celle de la flore indésirable (Ryser et Marth, 1991). Le moxalactame inhibe fortement la croissance des staphylocoques, des *Bacillus* spp. et des *Proteus*.

Un pré-enrichissement est recommandé dans le cas où certaines cellules bactériennes, survivant aux traitements de différentes natures, comme la pasteurisation et l'ionisation, ne peuvent récupérer leurs aptitudes à croître sur des milieux sélectifs (Stahl, 1989). À cette fin, on peut employer la technique d'enrichissement au froid, comme l'a fait Susan McCarthy et ses collaborateurs, suivie d'un enrichissement sélectif "au chaud". Nous retrouvons, à l'Annexe II, une liste de quelques milieux de cultures liquides qui sont utilisés pour l'enrichissement sélectif au chaud (30 à 37°C) de *L. monocytogenes*.

### 1.5.1.3 Isolement sélectif

En raison de la grande diversité des micro-organismes et du nombre réduit de *L. monocytogenes* ( $< 10^2$  ufc/mL ou g) présent dans les denrées alimentaires contaminées, il est impensable de vouloir l'isoler directement à l'aide de géloses non sélectives. Vu son nombre réduit, il est également difficile de l'isoler directement sur des géloses sélectives qui contiennent des agents chimiques qui nuisent à la multiplication des cellules abîmées par les traitements divers. Ce sont les raisons pour lesquelles on effectue un enrichissement au préalable en milieu liquide (Annexes I et II). Nous retrouvons, à

l'Annexe III, les milieux gélosés sélectifs les plus fréquemment utilisés pour mettre en évidence *L. monocytogenes* par rapport à la flore microbienne compétitrice.

La formulation du milieu Palcam, développée par Netten et ses collaborateurs (1989), doit sa sélectivité au chlorure de lithium (LiCl), à la ceftazidime, à la polymixine-B-sulfate et à l'acriflavine. Le diagnostic différentiel de *L. monocytogenes* se fait à l'aide d'un système d'indicateur double: l'esculine avec le citrate d'ammonium ferrique, puis le mannitol avec le rouge de phénol. *L. monocytogenes* hydrolyse l'esculine produisant un halo noir caractéristique autour des colonies de teinte gris verdâtre dont le centre est noir. Après 48 heures à 37°C, leur diamètre est d'environ 2 mm et le centre est légèrement affaissé. Certains entérocoques et staphylocoques qui fermentent le mannitol forment des colonies grises ou jaunes et produisent un changement de pH du milieu avoisinant. Ceci provoque un changement de couleur, du rouge au jaune, du système indicateur rouge de phénol, et les halos produits autour des colonies par ces autres bactéries, sont plutôt brun verdâtre ou jaunes.

Le milieu au chlorure de lithium-phényléthanol-moxalactame (LPM) fut développé par Lee et McClain (1986) afin de permettre la récupération de *L. monocytogenes* à partir d'échantillons hautement contaminés par une flore microbienne diversifiée. Dans sa formulation, l'anhydride de glycine a été employé pour augmenter les chances d'isolement du germe pathogène, le LiCl et le phényléthanol ont été également ajoutés afin d'accentuer la suppression des bactéries Gram-négatif et Gram-positif autres que *Listeria*, puis le moxalactame pour inhiber les staphylocoques, les *Bacillus* spp et les *Proteus*. On

conseille d'examiner les colonies formées sur le milieu LPM à l'aide du système de transillumination oblique proposé il y a plus d'un demi-siècle par Henri (Warburton et al., 1992). Observées sous cette condition, les colonies de *Listeria* spp. ressemblent à des tas de verre blanchâtre pilé présentant une irridescence bleu gris scintillante, tel que déjà mentionné à la page 19.

La formulation du milieu Oxford, pour l'isolement de *Listeria* spp. à partir de cultures microbiennes mixtes, fut proposée par Curtis et collaborateurs (1989). La différenciation se fait grâce aux ions ferriques, fournis par le citrate d'ammonium ferrique, qui permettent la visualisation de la réaction produite par les bactéries capables d'hydrolyser l'esculine. L'hydrolyse de celle-ci provoque la formation du composé 6,7-dihydroxycoumarin qui en réagissant avec les ions ferriques, conduit à l'apparition d'un halo noir autour des colonies également noires (Fraser et Sperber, 1988). La sélectivité du milieu Oxford est garantie par l'ajout de LiCl, de colistine-sulfate, de cycloheximide, d'acriflavine, de céfotétan et de fosfomycine. Avec la suppression de ces quatre derniers, la réduction de colistine-sulfate de moitié, puis l'ajout de moxalactame, Lee et McClain (1986) ont modifié le milieu Oxford pour le rendre encore plus sélectif.

#### **1.5.1.4 Identification**

L'identification se fait à partir des colonies caractéristiques qui ont été transférées sur GTS-EL (0,6%), puis incubées à 30°C durant au moins 24 heures. Sous éclairage oblique les colonies poussant sur ce milieu présentent les mêmes caractéristiques que celles formées sur LPM (voir plus haut).



Pour compléter l'identification des colonies suspectées d'être *Listeria* spp., il est suggéré de procéder aux épreuves de confirmation suivantes: mobilité, Gram et catalase. Toutes les espèces de *Listeria* présentent de petits bâtonnets Gram-positif, catalase plus, qui manifestent leur mobilité dans un montage humide et dans le milieu à faible concentration d'agarose (*Listeria motility test medium*). En outre, elles n'hydrolysent pas l'urée, elles acidifient la surface inclinée et le culot du milieu "Triple Sugar Iron Agar" (TSIA) sans production de H<sub>2</sub>S et elles fermentent le dextrose, l'esculine et le maltose. Les épreuves de la fermentation des trois sucres, ainsi que celles faisant usage du milieu à l'urée et du milieu TSIA sont facultatives.

Tel que déjà spécifié dans le Tableau 1-II, pour l'identification de *Listeria* jusqu'au niveau des espèces, il est suggéré de procéder aux épreuves suivantes:

- fermentation des sucres (mannitol, rhamnose et xylose),
- recherche de l'activité hémolytique,
- réactions Méthyl-Rouge/Voges-Proskauer (MR-VP)
- réduction de nitrate,
- réaction de CAMP (Darling, 1975).

Aux fins de l'essai CAMP, on étale en stries verticales une souche de *Staphylococcus aureus* et une souche de *Rhodococcus equi* bêta hémolytiques sur une gélose au sang de mouton ou de cheval. L'espace entre les stries verticales doit être suffisant pour permettre d'étaler en stries horizontales les souches à tester sans toucher aux souches hémolytiques. Après 24 à 48 heures d'incubation à 35°C, on recherche les zones

d'hémolyse à proximité des stries verticales. L'hémolyse de *L. monocytogenes* et de *L. seeligeri* est accrue au voisinage de la strie de *Staphylococcus aureus* et celle de *L. ivanovii* l'est au voisinage de la strie de *Rhodococcus equi*. Les autres espèces de *Listeria* ne donnent pas d'hémolyse à l'essai CAMP. Cet essai permet de distinguer *L. ivanovii* de *L. seeligeri* qui est parfois confondue avec *L. welshimeri* (Warburton et Farber, 1990).

Certaines espèces fermentent le mannitol, le rhamnose et le xylose avec production d'acide. Un isolat qui fermente le mannitol avec production d'acide est soit *L. grayi* ou *L. murrayi*. La réduction du nitrate permet de différencier ces deux espèces puisque *L. murrayi* réduit le nitrate.

Des trois espèces donnant d'hémolyse à l'essai CAMP, seule *L. monocytogenes* n'utilise pas le xylose mais fermente le rhamnose.

Parmi les espèces non hémolytiques, *L. innocua* peut donner les mêmes réactions à l'égard du rhamnose et du xylose que *L. monocytogenes*, mais sa réaction de CAMP est négative. *L. innocua* est la seule espèce qui donne parfois des résultats négatifs en ce qui concerne l'utilisation du rhamnose et du xylose.

Les épreuves sérologiques, la pathogénicité pour la souris et la détermination du sérotype sont des épreuves complémentaires d'intérêt épidémiologique et elles sont facultatives.

### **1.5.2 Méthodes de détection rapide**

Puisque les méthodes traditionnelles de dépistage et d'identification des pathogènes dans les denrées alimentaires présentent des délais de réponse très longs et sont souvent

laborieuses, les scientifiques se sont mis à chercher et à développer de nouvelles méthodes plus rapides et d'exécution plus simple permettant de détecter les micro-organismes nuisibles avec la même sensibilité que les procédures conventionnelles.

Déjà les recherches effectuées dans le domaine de l'immunologie et de la génétique microbienne ont porté fruits utilisant des anticorps fluorescents, de tests immunoenzymatiques ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") et de techniques utilisant des sondes d'acide nucléique. Plusieurs trousse permettant l'identification de micro-organismes d'importance médicale, tels que *L. monocytogenes*, par le biais de tests biochimiques accélérés, ont également été développées.

On trouve dans le commerce plusieurs de ces trousse dont l'utilité pour l'identification rapide de *L. monocytogenes* a déjà été évaluée. Parmi celles-ci, nous citons les trousse API 20 STREP, API 50CH et API-ZYM de la compagnie Analytab Products Inc., la trousse MICRO-ID de la compagnie Organon Teknika, les trousse Minitek System et Vitek Automicrobic System de la compagnie AMS et la trousse Mast ID System de la compagnie Mast Laboratories. Ces trousse, composées de galeries ayant une batterie de tests biochimiques, permettent l'identification rapide de *L. monocytogenes* à partir d'une culture pure du micro-organisme à identifier. En utilisant ces trousse, plutôt que les épreuves d'identification prescrites par les méthodes traditionnelles, on peut réduire à quelques heures le délai d'identification qui dure normalement 5 jours. Toutefois, l'obtention de cultures pures à partir des aliments et de l'environnement n'est pas toujours une tâche facile. En employant les méthodes conventionnelles FDA, USDA

et MFHPB-30 (Warburton *et al.*, 1992), l'isolement de colonies présumées être *Listeria* spp. peut prendre 3 à 4 jours. Donc, même si les trousse favorisent une réduction des délais d'identification de *L. monocytogenes*, les essais ELISA et les sondes d'ADN semblent être plus intéressantes parce que ces derniers n'exigent pas l'utilisation de cultures pures et peuvent détecter les micro-organismes appartenant au genre *Listeria* dans un bouillon de culture renfermant une microflore mixte (Ryser et Marth, 1991).

Plusieurs laboratoires ont utilisé avec succès la procédure des anticorps fluorescents pour dépister et isoler *L. monocytogenes* à partir de spécimens cliniques dans lesquels la bactérie se trouve en culture à peu près pure. L'emploi de cette même procédure dans les laboratoires de microbiologie alimentaire s'est avérée inefficace. Étant donné l'importance de la microflore contaminante et les faibles taux de contamination des aliments par *Listeria* spp., le nombre de réactions croisées avec des micro-organismes autres que *Listeria* spp. était souvent très élevé (Cassiday et Brackett, 1989).

Donnelly et collaborateurs (1988) ont amélioré la procédure des anticorps fluorescent en utilisant la méthode de cytofluorométrie de flux. À l'aide de la méthode améliorée, les chercheurs ont réussi à faire une caractérisation rapide de *L. monocytogenes* dans le lait cru, selon les critères morphologiques, le contenu en acide nucléique et l'antigénicité. Néanmoins, cette procédure a produit un degré élevé de faux-positifs. Ce qui les a amené à proposer l'usage d'anticorps monoclonaux, plus spécifiques, afin justement de réduire la marge d'erreur.

Les tests ELISA se classent parmi les tests de dépistage rapides les plus étudiés.

Ils sont basés sur le principe qu'un anticorps peut se lier à une enzyme peroxydase ou phosphatase pour former un conjugué qui porte à la fois l'activité immunologique et enzymatique. On se sert justement de cette double activité pour dépister *Listeria* spp.. L'extrémité qui porte l'activité immunologique reconnaît l'antigène et s'y lie de façon spécifique, laissant l'extrémité qui porte l'activité enzymatique libre pour réagir avec un substrat donné. Cette réaction provoque donc un changement de couleur là où il y a eu reconnaissance anticorps-antigène. Le degré du changement de couleur, déterminé visuellement ou à l'aide d'un spectrophotomètre, est directement proportionnel à la quantité d'antigène présent dans l'échantillon. En se basant sur ces principes, Farber et Speirs (1987) ont développé une méthode ELISA pour le dépistage rapide de *Listeria* spp. contaminant le lait. Un échantillon de lait était filtré à travers une membrane de nitrocellulose que l'on plaçait sur une gélose sélective incubée par la suite à 30°C pendant 48 heures. Ils dépistaient *Listeria* spp. sur la membrane à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique. La même technique fut employée pour dépister ce germe pathogène dans les fromages et le boeuf haché. Quoique l'on ait réussi à détecter *Listeria* spp. après deux ou trois jours et que des réactions croisées des autres germes, avec l'anticorps utilisé, n'aient pas eu lieu, la caractérisation de *Listeria* au niveau de l'espèce ne fut pas possible, ceci en raison de la similitude des réaction inter-générique (Farber et Speirs, 1987; Faber et al., 1988a). Mattingly et collaborateurs (1988) ont décrit une méthode ELISA pour la détection de *Listeria* spp. à l'aide de deux anticorps monoclonaux. Pour ce faire, les échantillons de produits laitiers, de boeuf, de poulet et

de produits de la mer doivent d'abord subir un enrichissement dans un bouillon sélectif durant 40 à 48 heures à 30°C afin d'augmenter la population de *Listeria* spp.. L'usage de deux anticorps monoclonaux a rendu la méthode hautement spécifique, toutefois le niveau de précision de l'identification est resté au niveau du genre *Listeria*.

Les techniques qui emploient les sondes d'acides nucléiques pour le dépistage rapide de micro-organismes pathogènes des aliments ont connu un essor remarquable au cours de ces dernières années (Ryser et Marth, 1991). Klinger et collaborateurs (1988) ont développé un essai d'hybridation pour détecter *Listeria* spp. dans les produits laitiers et dans les échantillons environnementaux. Lors de ces essais, ils pouvaient détecter, en moins de 2 jours et demi, à l'aide d'une sonde ADN marquée au P<sup>32</sup> des séquences spécifiques de la fraction ribosomale 16S de l'ARN de *Listeria* spp. présente dans des cultures enrichies. Aucune des 73 cultures de micro-organismes, Gram-positifs et Gram-négatifs, autres que *Listeria* spp., présentant toutefois un quelconque lien physiologique et/ou génétique avec ces dernières, n'ont été reconnues par leur sonde d'ADN marquée au P<sup>32</sup>. Ils ont dû, néanmoins, apporter des modifications à la formulation du bouillon d'enrichissement afin d'empêcher la croissance de *Brochothrix* dont les fragments 16S de l'ARNr sont très apparentés à ceux de *Listeria* spp.

Les sondes d'acide nucléique de *L. monocytogenes* doivent idéalement être préparées à partir des gènes qui codent pour un facteur virulent. Parmi les facteurs qui contribuent à la virulence de *Listeria*, on trouve les hémolysines (listériolysines), le facteur-CAMP et une protéine qui cause de l'hypersensibilité de type retardé (HTR).

Leimeister-Wachter et Chakraborty (1989) ont préparé plusieurs sondes à partir des gènes qui codent pour ces facteurs de virulence et les ont utilisées dans le but de dépister *Listeria* spp.. Ces différentes sondes marquées au P<sup>32</sup> ont permis l'identification de *Listeria* spp. La sonde préparée à partir du gène qui code pour la protéine HTR-18 a été la seule à pouvoir détecter les espèces reconnues pathogènes, *L. monocytogenes* et *L. ivanovii*.

Plus récemment, on a remplacé les marqueurs radioactifs des sondes d'acides nucléiques par des marqueurs non isotopiques (enzymes ou produits chimiluminescents) afin de les rendre moins chers et d'éliminer les problèmes d'usage et d'élimination du matériel radioactif (Kim et al., 1991).

Peterkin et collaborateurs (1992) ont développé une méthode qui utilise une sonde ADN marquée avec la digoxigénine. Cette sonde s'hybride spécifiquement avec les colonies de *L. monocytogenes* se multipliant sur une membrane-filtre hydrophobe (HGMF). Ils ont utilisé cette méthode pour dépister le germe d'un nombre restreint d'échantillons de trois types d'aliments (fromage à pâte molle, lait cru et poulet haché) contaminés artificiellement. Par leur étude, on constate que la méthode rapide utilisant une sonde d'ADN a fonctionné aussi bien que les méthodes conventionnelles FDA et USDA. L'utilisation de la filtration sur membrane comporte un désavantage, parce que les cellules traitées ne sont pas récupérables pour le besoin d'une confirmation ultérieure (Cassiday et Brackett, 1989).

Une autre recherche récente a évalué la spécificité et la sensibilité d'un système de dépistage rapide de *L. monocytogenes* commercialisé par Gene-Probe (San Diego,

Californie). La sonde d'ADN dirigée contre la fraction 16S de l'ARNr de *Listeria* spp, est marquée avec le réactif ester d'acridinium. Lorsqu'il y a hybridation de la sonde d'ADN avec l'ARNr, l'ester d'acridinium n'est plus disponible pour subir l'hydrolyse; il peut toutefois réagir avec le peroxyde d'hydrogène en milieu alcalin et produire une chimiluminescence. À l'aide de la sonde d'ADN Gene-Probe, on a analysé trois types d'aliments (poulet cru, pâté et fromage brie) faiblement contaminés par *L. monocytogenes* ( $2 \leq \text{ufc/g} \leq 7$ ) préalablement suspendus dans les bouillons FDA, USDA et Palcam, de. La sonde a permis de confirmer très rapidement la présence, tout en présentant une bonne spécificité et un seuil de sensibilité de détection d'approximativement  $10^6$  *L. monocytogenes* par millilitre, en culture pure. Le succès du dépistage avec cette sonde, tout de suite après l'étape d'enrichissement, s'est montré être largement dépendant du type d'aliment et du bouillon d'enrichissement utilisé (Bobbitt et Betts, 1992).

## 1.6 L'INDUSTRIE ALIMENTAIRE ET *L. MONOCYTOGENES*

Suite aux nombreuses épidémies survenues en Amérique du Nord et en Europe durant la première moitié des années 80, l'OMS a conclu que *L. monocytogenes* est une bactérie répandue dans l'environnement dont la transmission à l'homme se fait d'abord et avant tout par les denrées alimentaires contaminées durant les étapes de transformation (OMS, 1988).

Avant d'établir les point critiques qui permettront de mieux contrôler les risques de contamination dans la chaîne de production, il est nécessaire de rappeler les



caractéristiques de croissance qui expliquent l'habileté de *Listeria monocytogenes* de s'établir malgré les conditions de survie les plus adverses et éventuellement de se développer par la suite:

- . cette bactérie croît aux températures de réfrigération utilisées pour prolonger la conservation des produits périssables;
- . sa croissance est favorisée sous de faibles concentrations d'oxygène et davantage lorsque les concentrations de CO<sub>2</sub> sont élevées;
- . elle est tolérante à des concentrations élevées de sel, 10% de NaCl, donc à des faibles activités de l'eau;
- . elle ne survit pas à la pasteurisation de 71,1°C durant 15 secondes dans le lait, mais elle est probablement capable de survivre à des combinaisons de température/temps plus sévères dans des aliments présentant une activité d'eau (a<sub>w</sub>) réduite (Skovgaard, 1989).

Au Canada, parmi les aliments susceptibles d'être contaminés par *L. monocytogenes*, on peut identifier le fromage, la crème glacée, le lait non pasteurisé, les pâtes, le boeuf, le boeuf haché, le porc, le jambon, la saucisse, le salami, la viande fumée, le homard, les crevettes, le crabe, le saumon fumé, les légumes crus et les comprimés de luzerne. On a également trouvé la bactérie dans les usines de transformation des aliments et sur les vêtements des travailleurs. Les seuls aliments qui ne risquent pas de contenir cette bactérie pathogène sont ceux qui ont été pasteurisés, irradiés, cuits ou marinés immédiatement avant le conditionnement ou la consommation (Santé et Bien-être social Canada, 1991; Farber *et al.*, 1988).

*Listeria monocytogenes* est capable de survivre aux étapes de transformation, de maturation et de stockage d'une grande variété de fromages. Il y a une incidence accrue du microorganisme, qui peut être présent en grandes quantités, lorsque les fromages subissent beaucoup de manipulation durant les étapes de transformation et, de plus, ceux-ci sont normalement des produits à peine légèrement acides. Dans ce contexte, ce sont les fromages à pâte molle, qui ont un pH plutôt neutre près de la surface, qui sont les plus souvent trouvés contaminés par *Listeria monocytogenes*. Ce niveau de contamination peut être aussi élevé que  $10^7$  ufc/mL (Farber, 1991b).

L'incidence de *Listeria monocytogenes* est approximativement de 30 à 50% dans les viandes crues, de 15 à 60% dans les volailles et de 5 à 23% dans les saucisses fermentées (Johnson *et al.*, 1988; Destro *et al.*, 1991; Rorvik et Yndestad, 1991). La contamination fécale est une voie de contamination naturelle par *Listeria monocytogenes* de la viande de boeuf et de poulet crue. Quoiqu'un lien épidémiologique entre la listériose humaine et la consommation de boeuf ou de poulet n'ait pas été encore établi, il est probable qu'elle y joue un rôle. Des données de l'"American Meat Institute", sur l'incidence de *Listeria* spp. dans 41 usines de production de viandes, montrent qu'entre 5 et 37% des planchers, des drains, des surfaces de contact, des murs et même des plafonds de secteurs situés en aval des traitements thermique sont contaminés (Skovgaard, 1989). *Listeria monocytogenes* est aussi capable de se propager dans des produits charcutiers emballés sous vide, pourvu que ceux-ci soient gardés longtemps.

### 1.6.1 Les fruits de mer et *Listeria monocytogenes*

Le rapport "Listérioses d'origine alimentaire" de l'OMS, publié après la réunion convoquée d'urgence à Genève en 1988, insiste pour qu'au cours des enquêtes menées lors d'épidémies une grande attention soit accordée au rôle potentiel des aliments dans la transmission de *Listeria monocytogenes*. Le rapport rappelle aussi que l'on disposait de peu d'informations, mais que "des analyses récentes laissent penser que le poisson cuit ainsi que d'autres fruits de mer peuvent également être contaminés par *Listeria monocytogenes*". Brackett émet l'hypothèse que l'eau contaminée peut infecter les poissons et les fruits de mer qui à leur tour infectent l'homme, qui les consomment (Brackett, 1988). Des *Listeria* spp. furent détectées dans 81% des échantillons d'eau douce et 33% des échantillons d'eau de mer (Colburn *et al.*, 1990).

Quatre à 8% de la chair de crabe cuite, ainsi que 3 à 4% des crevettes, révèlent la présence de *Listeria monocytogenes* à l'analyse. Chez les crevettes congelées, une étude quantitative utilisant les sondes d'ADN révélait que l'on peut trouver 200 de ces bactéries au gramme (OMS, 1988).

Weagant et ses collaborateurs (1988) ont isolé *Listeria monocytogenes* (26%) et *Listeria innocua* (46%) de 57 échantillons de produits de la mer congelés. *Listeria monocytogenes* fut récupérée dans 28% des échantillons de crevettes crues congelées. Les sérotypes isolés étaient le 1/2a et le 4b.

Récemment, Motes (1991) a analysé plus de 227 échantillons d'huîtres, de crevettes et d'eaux collectés le long de la côte du Golfe du Mexique. Des *Listeria* spp.

ont été récupérées plus souvent de la crevette que de l'eau, mais n'ont pas été isolées des échantillons d'huîtres. La récupération de *Listeria* spp. a été plus importante lorsque la température de l'eau de mer était inférieure à 20°C, et 50% des échantillons de crevettes contaminés furent prélevés à des températures inférieures à 20°C. Le degré de salinité de l'eau de mer n'a pas affecté la récupération. Des 227 échantillons analysés seulement 11 étaient contaminés par *Listeria monocytogenes*, dont 6 provenaient de la crevette. Les auteurs considèrent que l'incidence de *Listeria* spp. chez la crevette était faible, mais que la crevette représente une source potentielle de contamination des usines de transformation et des produits qui y sont manipulés.

Farber a analysé un nombre limité d'échantillons (154) de produits marins et a constaté que des produits prêt-à-manger, tels que la crevette et le saumon fumé, sont souvent contaminés par *Listeria monocytogenes*. Le chercheur pense toutefois que le niveau de contamination de *Listeria* dans les produits de mer cuits est trop faible, pour que l'on craigne que ces produits contaminés deviennent un danger pour la santé publique. Pour affirmer cela, Farber se fie à la vitesse de rotation des stocks des produits marins, à la manipulation adéquate de ceux-ci et présume que l'on respecte la température de conservation (Farber, 1991a).

En Norvège, on a isolé des *Listeria monocytogenes* de sérotypes ½ et 4 dans 18% des échantillons de crevettes décortiquées (Rorvik et Yndestad, 1991). Ces chercheurs rappellent que la saumure utilisée dans les usines de Norvège pour décortiquer la crevette est à un pH d'environ 6,0; ce qui peut favoriser le développement de la bactérie.

Plusieurs vérifications de la présence de *Listeria* dans les produits de mer, importés et pêchés aux États-Unis, indiquent que *Listeria monocytogenes* est présente dans une proportion de 5 à 6% (Kvemberg, 1988).

Harrison et ses collaborateurs (1991) ont étudié le comportement de *Listeria monocytogenes* dans les produits de mer emballés sous films plastiques de caractéristiques différentes et gardés réfrigérés ou congelés. Dans la crevette, ils n'ont observé qu'une faible réduction (< 1 cycle logarithmique) du germe, après 3 mois à -20°C et après 21 à 0°C, peu importe le type d'emballage.

### **1.7 IRRADIATION ET RADIORÉSISTANCE DE L. MONOCYTOGENES**

Quoiqu'on ait reconnu depuis plus d'une décennie l'innocuité des denrées ionisées à des doses moyennes inférieures à 10 kGy (FAO/IAEA/WHO, 1981), l'emploi de la technologie de l'ionisation a cependant connu un progrès relativement lent. Au Canada, bien que permise pour plusieurs aliments, l'irradiation n'est utilisée que pour les épices. Par contre, nous retrouvons déjà des denrées irradiées sur les marchés d'Europe, d'Asie, d'Afrique et d'Amérique.

Le procédé d'ionisation des aliments trouve les applications suivantes dans l'industrie agro-alimentaire; les doses recommandées sont mentionnées entre parenthèses (Giddings, 1983):

- l'inhibition du processus physiologique post-récolte, tel le mûrissement de certains fruits tropicaux, la germination des pommes de terre et des oignons, l'élongation des tiges des

- asperges, des champignons et l'ouverture du chapeau des champignons (0,05 à 3,0 kGy);
- la stérilisation et/ou la destruction d'insectes, des oeufs et des larves d'insectes (0,1 à 1,0 kGy);
  - la destruction des parasites infectieux (0,5 à 5,0 kGy);
  - la destruction de la flore de décomposition telles que les bactéries, les levures et les moisissures (0,5 à 5,0 kGy);
  - la destruction des micro-organismes pathogènes alimentaires dans les produits frais et congelés (1,0 à 7,0 kGy);
  - la stérilisation de matériel d'emballage (< 10 à 30 kGy);
  - L'amélioration des propriétés physiologiques telles que l'accroissement de la productivité de jus de fruits pressées et l'augmentation de la vitesse de réhydratation des végétaux déshydratés (1,0 à 50 kGy).

L'irradiation est un procédé par lequel les aliments sont exposés à des radiations ionisantes qui, classiquement, produisent deux effets distincts:

- un effet direct des rayonnements sur la matière: l'effet cible. Il a pour conséquence la rupture des molécules ou l'apparition de liaisons inter ou intramoléculaires; l'exemple classique est celui de l'ADN;
- un effet indirect qui apparaît à cause de la radiolyse de l'eau, étant donné que les entités chimiques formées vont pouvoir migrer et réagir entre elles ou avec d'autres constituants.

Dans les cellules vivantes, les effets biologiques de l'irradiation se manifestent

surtout par un blocage très souvent irréversible de la division cellulaire. L'irradiation induit dans l'ADN et l'ARN des modifications chimiques qui sont quantitativement peu importantes, mais qui peuvent être de nature variée du fait de la complexité des molécules. Une infime modification chimique des acides nucléiques peut provoquer un blocage de la duplication de l'ADN, s'il n'existe pas de processus de réparation pour le type de lésion créé. Le processus de synthèse des protéines s'arrête aussitôt que l'ARNm rencontre un codon modifié pour lequel il n'existe pas d'ARNt correspondant.

Les effets de l'irradiation sont communs à tous les organismes vivants. Cependant, la radiosensibilité est fonction de la complexité de l'organisme ainsi que du degré de son évolution. Donc, plus on avance dans l'échelle évolutive, plus la radiosensibilité est grande. Concernant les bactéries d'importance alimentaire, on établit une distinction majeure entre les spores bactériennes résistantes au rayonnement ionisant et les cellules végétatives qui sont généralement sensibles à ce même traitement. Il faut toutefois rappeler les exceptions à la règle. Les bactéries Gram-positif, telles que *L. monocytogenes*, sont reconnues plus radiorésistantes que les bactéries Gram-négatif, parmi lesquelles nous retrouvons beaucoup de bactéries pathogènes.

En 1988, les États-Unis ont capturé près de  $1,8 \times 10^6$  tonnes métriques de produits marins. En 1987, la consommation per capita en Amérique de ces produits a approché les 7,0 kg (O'Bannon, cité par Liston, 1990).

Aux États-Unis, entre 1977 et 1984, les produits marins se sont trouvés au premier rang (24,8%) des aliments impliqués dans les cas de maladies d'origine alimentaire. En

1987, aux États-Unis, les maladies d'origine alimentaire causées par des bactéries ont coûté 4,8 milliards de dollars en devises américaines. Les 1581 cas de listériose leur ont coûté 213 millions de dollars (Dillon et Patel, 1992).

Durant leur transformation en usine, l'ubiquité de *L. monocytogenes* dans la nature rend difficile la prévention de la contamination de certains produits susceptibles. L'utilisation de la technologie de rayonnement ionisant a alors été suggérée afin d'éliminer *L. monocytogenes* de telles denrées (OMS, 1988).

Perng et Yang (1990) ont étudié l'effet de l'irradiation ionisante sur l'ultrastructure des muscles de crevette à la température ambiante et à -18°C à l'aide de la technique de microscopie de transmission d'électrons. Ils n'ont pas observé de changements dans l'ultrastructure musculaire de la crevette traitée à 2,0 ou à 5,0 kGy, puis stockée à 0°C pendant 8 jours. Par contre, ils observèrent que la congélation (-18°C) conférait un effet protecteur sur la crevette car son ultrastructure musculaire n'a pas subi de modifications lorsqu'elle fut traitée à 10 kGy.

L'irradiation a déjà été utilisée avec succès afin d'éliminer *L. monocytogenes* et/ou d'autres pathogènes non sporulés du boeuf, du porc, de la volaille et de la crevette (Charbonneau, R. et al., 1986; El-Shenawy et al., 1989; Huhtanen et al., 1989; Matic et al., 1990; Mead et al., 1990; Nerkar et Bandekar, 1990).

El-Shenawy et collaborateurs (1989) ont déterminé des valeurs de DRD pour la souche Scott A, traitée dans un bouillon riche (DRD moyenne entre 0,34 et 0,50 kGy) et dans le boeuf (DRD moyenne entre 0,51 et 1,00 kGy). La Dose de Réduction Décimale



(DRD) est définie comme la dose capable de provoquer la destruction de 90% de la flore microbienne initiale.

En se basant sur les résultats de plusieurs recherches sur la radiorésistance de plusieurs pathogènes, Ryser et Marth (1991) ont constaté que *L. monocytogenes* possède une radiorésistance égale à ou légèrement plus élevée que celles de *Salmonella typhimurium*, de *Staphylococcus aureus*, de *Yersinia enterocolitica* et de *Campylobacter jejuni*.

Patterson (1989) a observé que les suspensions cellulaires de quatre souches de différents sérotypes isolées du lait, du fromage ou du poulet, présentaient une valeur de radiorésistance qui dépendait de l'environnement d'irradiation (solution saline ou poulet) ou du milieu gélosé sur lequel on étalait les aliquotes des échantillons traités. Selon Patterson, la radiorésistance de *L. monocytogenes* est comparable à celle des *Salmonella* spp. D'où sa conclusion que les doses entre 2,5 et 7,0 kGy suggérées pour l'élimination de *Salmonella* doivent aussi détruire *L. monocytogenes*.

Huhtanen et collaborateurs (1989) ont constaté une radiorésistance plus élevée des cellules en phase stationnaire, qu'une dose de 2,0 kGy serait capable d'éliminer 10<sup>4</sup> cellules de *L. monocytogenes* dans le poulet et que la radiorésistance des cellules qui avaient survécues à un premier traitement de 1,5 kGy n'est pas plus élevée que celle des cellules qui ont subi un seul traitement ionisant.

## 2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES

Trois souches de *L. monocytogenes* ont été utilisées dans la présente étude. La souche 19115, de sérotype 4b, est un isolat clinique obtenue auprès de l'«American Type Culture Collection» (ATCC), Rockville, Maryland, États-Unis. La souche 19111, de sérotype ½, a été isolée du poulet et provenait également de l'ATCC. Finalement, la souche FDA-1A1, de sérotype inconnu, qui fut isolée de la crevette, nous a été gracieusement donnée par le Dr. Susan A. McCarthy du «Fishery Research Branch» de la FDA, Dauphin Island, Alabama, États-Unis.

Deux autres souches de *Listeria*, *L. ivanovii* et *L. innocua*, utilisées comme souches témoins pendant les étapes d'identification, nous ont été gentiment fournies par le Dr. Marie-Josée Champagne, chef de la section de diagnostique bactériologique du Laboratoire d'hygiène vétérinaire et alimentaire d'Agriculture Canada, St-Hyacinthe.

Les souches de *Staphylococcus aureus* β hémolytique (CIP 5808) et de *Rhodococcus equi* (CIP 5710), utilisées pour le test de CAMP, nous a été gracieusement données par le Dr. J. Farber de la Division de Recherche du bureau de dangers microbiens, de la Direction des aliments, de Santé Canada, Ottawa.

### 2.2 PRÉPARATION DES CULTURES

Les cultures ci-haut mentionnées ont été reçues au Laboratoire de microbiologie du CRESALA® sur gélose inclinée ou à l'état lyophilisé. Dès leur arrivée, on les a

suspendues dans 100 mL de Bouillon Trypticase Soya-Extrait de Levure 0,6%» (BTS-EL) (Becton-Dickinson Microbiology System, États-Unis) que l'on incubait à 30°C durant 24 heures. Subséquemment, nous procédions à deux repiquages dans le même bouillon, de manière à garantir une bonne croissance.

### **2.2.1 Culture stock**

La préparation de la culture stock était faite dans des flacons de polyéthylène stériles (2 mL). Afin de protéger les suspensions cellulaires contre les effets nocifs de la congélation, nous avons, au préalable, mélangé à volumes égaux la suspension bactérienne à une solution de glycérol 80% (p/v) préparée avec de l'eau déionisée (Petran et Zottola, 1989). Pour chacune des cultures, nous avons préparé dix tubes renfermant chacun 1,5 mL du mélange. Les tubes furent entreposés à -80°C et repiqués annuellement.

### **2.2.2 Culture-mère**

Pour la préparation de la culture-mère, 1 mL du contenu du tube de la culture stock était transféré dans 100 mL de BTS-EL que l'on incubait à 30°C durant 24 heures. À partir de ce bouillon primaire, on transférait, en duplicata, une boucle dans 10 mL de BTS-EL qui était incubé à 30°C pendant 24 heures. Une boucle du bouillon de culture intermédiaire était striée, en triplicata, sur des Géloses Trypticase Soya-Extrait de Levure (0,6%) (GTS-EL), que l'on incubait à 35°C durant 48 heures. Les boîtes de Petri contenant la culture-mère étaient alors scellées avec une pellicule de parafine puis

transférées au réfrigérateur à 4°C. La culture-mère ainsi préparée était repiquée mensuellement.

### 2.2.3 Culture de travail

La culture de travail était préparée, en duplicata, à partir de la culture-mère. À partir de celle-ci et à l'aide d'une anse de platine stérile, cinq colonies caractéristiques, bien isolées, étaient transférées dans le BTS-EL (bouillon primaire), que l'on incubait à 30°C durant 24 heures. Ensuite, nous procédions à deux repiquages successifs du bouillon primaire, avec un délai de 24 heures d'incubation entre chaque repiquage afin de garantir une activité physiologique maximale de la culture de travail. Un tube renfermant du bouillon de culture de travail servait à la préparation d'échantillons pour l'étude de la radiorésistance de *L. monocytogenes*, alors que l'autre était aussitôt transféré au réfrigérateur à 4°C. Le repiquage hebdomadaire de la culture de travail se faisait durant quatre semaines, après quoi nous reprenions la préparation d'une nouvelle culture de travail à partir de la culture-mère.

Un ensemble de mesures de contrôle furent adoptées pour garantir la pureté des cultures de travail. En premier lieu, on mettait le BTS-EL stérile en "quarantaine" durant 48 heures à 30°C («Incubateur Narco 320-12, National Appliance Company, États-Unis) avant de les inoculer. Systématiquement, avant chaque repiquage, nous avons effectué le test de la coloration de Gram (Becton Dickinson Microbiology Systems, États-Unis) et le dénombrement de la population bactérienne dans les bouillons de culture à l'aide d'un compteur «Darkfield Quebec colony counter - 3321» (American Optical

Corporation, États-Unis). Les milieux gélosés utilisés à cette fin furent la GTS-EL, non sélective, et la gélose sélective Oxford (OXOID CM-856, Unipath Ltd, Angleterre). Le dénombrement des ufc/mL de la culture sur ces deux milieux gélosés nous permettait de nous assurer, à la fois, de la pureté et de la concentration en cellules. La culture de travail renfermait une population qui variait entre  $3,0 \times 10^9$  à  $7,0 \times 10^9$  ufc/mL à la fin de la période d'incubation.

Les repiquages étaient toujours effectués, à proximité d'un brûleur, à l'aide d'ustensiles stériles et à l'intérieur d'une hotte à flux laminaire («BioGard Hood», The Baker Company Inc., États-Unis), désinfectée avec une solution éthylique de "Dettol" 5%. Cette hotte était régulièrement stérilisée par des rayons UV. Ces mesures de contrôle nous ont toujours garanti l'obtention de cultures libres de contaminants.

### **2.3 PRÉPARATION DES BOÎTES DE PÉTRI**

On a apprêté les boîtes de Pétri (100x15 mm) jetables à l'aide d'une seringue automatique (Filamatic vial filler AB, National Instruments Co. Inc., États-Unis), préalablement calibrée pour délivrer un volume constant égal à 16 mL de milieu gélosé stérile ( $48 \pm 2^\circ\text{C}$ ). L'opération était réalisée, sous conditions aseptiques, à l'intérieur d'une hotte à flux laminaire où les boîtes de gélose restaient durant une nuit à la température ambiante et à l'abri de la lumière. Le lendemain, les boîtes ainsi préparées pouvaient être utilisées immédiatement ou elles étaient placées dans des sacs de polyéthylène et entreposées dans une chambre froide à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à 4 semaines.

Avant leur utilisation, les boîtes de gélose réfrigérées étaient tempérées à 22°C pendant 1 heure.

## 2.4 COURBES DE CROISSANCE

Dans le but de préciser le comportement de *L. monocytogenes* sur les trois milieux gélosés sélectifs recommandés par Santé Canada (Warburton *et al.*, 1992), nous avons établi la courbe de croissance de chacune des souches sur les milieux sélectifs Oxford, LPM et Palcam et nous les avons comparées à la courbe de croissance établie à l'aide du milieu non sélectif GTS-EL.

Des aliquotes des trois souches de *L. monocytogenes*, cultivées dans le BTS-EL à 30°C, ont été prélevées à différents moments et ensemencées sur les quatre milieux gélosés. Les expériences ont été réalisées en duplicata comme suit. Un volume de 100 mL de BTS-EL stérile était d'abord inoculé avec 1,0 mL de la culture de travail fraîchement sortie de l'incubateur à 30°C puis placé dans un incubateur-agitateur (Environmental incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co. Inc., États-Unis) réglé à 30°C et à une vitesse d'agitation correspondant à 180 rpm. À des intervalles variant entre 1 et 2 heures, durant les premières 8 heures, 1,0 mL du bouillon de culture était prélevé et une série de dilutions (1:10) était préparée dans de l'eau peptonée à 0,1%. Finalement, des aliquotes de 0,1 mL de chacune des dilutions servaient à ensemercer, en triplicata, les géloses.

Les milieux GTS-EL et Oxford étaient incubés à 35°C sous aérobiose, le LPM

était incubé à 30°C sous aérobiose et le Palcam était incubé à 37°C en microaérobiose dans une étuve (Queue Systems, États-Unis) dont la composition des gaz (Linde, Canada) à l'équilibre correspondait à: 85% d'azote, 10% de CO<sub>2</sub> et 5% d'O<sub>2</sub> (Netten et al., 1989). Après 48 heures d'incubation, on effectuait le dénombrement des ufc/mL. Seules les boîtes de gélose présentant des valeurs entre 30 et 300 colonies, inclusivement, étaient retenues et les valeurs servirent à tracer les graphiques et à calculer le temps de génération (G) à partir de la portion du graphique qui démontrait une croissance exponentielle de la culture.

Nous nous sommes servis du logiciel "Sigmaplot scientific graph system", version 4.02, 1990 (Jandel Scientific, États-Unis), pour tracer les courbes de croissance. Le temps de génération fut calculé par la formule:

$$G = t/[3.3 \log(b/B)]$$

où

$G$  = temps de génération;

$t$  = intervalle de temps entre le dénombrement des cellules de la population à un moment pendant la phase exponentielle ( $B$ ) et à un moment ultérieur ( $b$ );

$B$  = population initiale;

$b$  = population après un temps  $t$ .

## 2.5 ÉTUDE DE LA RADIOSENSIBILITÉ DE *L. MONOCYTOGENES*

Les expériences suivantes ont été réalisées dans le but de déterminer la radiosensibilité de trois souches de *L. monocytogenes* en suspension dans trois environnements distincts: bouillon de culture, eau physiologique et crevette (homogénéisée et entière). Nous avons aussi effectué la détermination de la radiosensibilité des souches à 0 et à -20°C, températures couramment employées dans l'industrie alimentaire pour conserver les denrées périssables. On a voulu finalement vérifier la radiosensibilité des souches pathogènes en relation avec leur phase de croissance.

### 2.5.1 Préparation de la suspension dans le BTS-EL

Le BTS-EL fut le premier environnement dans lequel on a déterminé la radiosensibilité des trois souches de *L. monocytogenes* aux deux phases de croissance différentes. Les expériences ont été réalisées en triplicata. Les fioles contenant 100 mL de BTS-EL stérile étaient inoculées avec 1 mL de la culture de travail (voir 2.2.3) et placées dans un incubateur/agitateur (180 rpm) à 30°C. Lorsque la valeur de la densité optique (mesurée à 370 nm) des bouillons de culture variait entre 0,238 et 0,637, la population bactérienne, cultivée sur GTS-EL, oscillait entre  $8,2 \times 10^7$  et  $4,7 \times 10^8$  ufc/mL. Ceci équivalait, sur la courbe de croissance, à une population bactérienne en pleine phase exponentielle de croissance. Par contre nous avons observé, à l'aide des courbes de croissance, que lorsque la densité optique des bouillons de culture atteignait des valeurs entre 2,32 et 2,37, la population bactérienne de  $3,6 \times 10^9$  à  $6,7 \times 10^9$  ufc/mL était en début



de la phase stationnaire de croissance. Vu que nous allions nous servir des ces préparations pour comparer les valeurs de la DRD des cellules en phase exponentielle, avec celles des cellules en début de la phase stationnaire, nous avons effectué une dilution (1:10) du bouillon de culture renfermant les cellules en début de la phase stationnaire dans du BTS-EL stérile afin de ramener sa population à une valeur comparable à celle du bouillon de culture des cellules en phase exponentielle. L'étape suivante était celle de la préparation des échantillons. Pour ce faire, on transférait des aliquotes de 3 mL de la suspension cellulaire, en phase exponentielle ou en début de la phase stationnaire, dans des tubes coniques de 15 mL (62553002 PS, Sarstedt Canada Inc., Canada). Ces tubes d'échantillons dûment identifiés étaient gardés dans de la glace concassée jusqu'au moment d'être soumis au traitement ionisant.

### **2.5.2 Préparation de la suspension dans la solution physiologique**

Dans cette étape, nous nous sommes limités à la souche FDA-1A1 isolée de la crevette, car notre intérêt était plutôt de connaître le comportement de *L. monocytogenes* suspendue à 0 et à -20°C dans l'eau physiologique qui n'exerce aucune protection face au traitement ionisant. Les données issues de cette étape nous permettant également d'effectuer une étude comparative étendue, puisque nous avons déjà déterminé la DRD de la souche dans le BTS-EL et que nous la déterminerons ultérieurement dans la crevette homogénéisée et entière.

Un volume de 50 mL de bouillon de culture, en début de la phase stationnaire (voir 2.5.1), fut transféré dans un tube conique stérile(T4158-50R, B-D and Company, États-

Unis) puis centrifugé à 3100rpm durant 7 minutes. Le surnageant, qui était rejeté après stérilisation, était remplacé par une solution physiologique stérile froide et le culot était resuspendu à l'aide d'un Vortex («Vortex-Genie», Fisher Scientific Industries, États-Unis). L'opération de lavage du culot de cellules était répétée deux autres fois afin de garantir l'élimination des résidus de bouillon de culture puis le culot fut resuspendu dans 100 mL de solution physiologique stérile et froide. À partir de cette suspension, on préparait deux séries de 18 échantillons en transférant des aliquotes de 3 mL dans des tubes coniques de 15 mL. Une des ces séries était entreposée à 0°C durant une nuit sur glace concassée, pendant que l'autre était placée dans la chambre à  $-22 \pm 2^\circ$  pour le même temps.

### 2.5.3 Préparation de la crevette

La crevette fut le troisième environnement choisi pour déterminer la radiosensibilité de *L. monocytogenes*. La radiosensibilité des souches ATCC 19115 et FDA-1A1 a été déterminée à deux températures distinctes, 0°C et -20°C. Lors de la détermination de la DRD des souches dans du BTS-EL, ces deux souches s'étaient avérées, respectivement, une la moins radiosensible et l'autre la plus radiosensible. Nous avons donc pensé que cet écart de la DRD entre les souches nous permettrait de mieux montrer le rôle radioprotecteur joué par la crevette à cause de sa composition riche en protéines et en lipides. Les échantillons utilisés dans cette deuxième étape de l'étude avaient été préstérilisés à 25 kGy.

Les boîtes de crevettes utilisées nous ont été gracieusement données par la compagnie Nordion International Inc., Canada. La crevette «Black Tiger» (*Penaeus*

*monodon*) était emballée dans des boîtes contenant 2 kg et entreposées à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$  dans le congélateur du CRESALA® à l'Institut Armand-Frappier. La compagnie Kingfisher Holdings Ltd prépare et emballe, en Thaïlande, ces crevettes congelées et les exporte dans plusieurs pays du monde. La crevette se présentait congelée, sans tête, sans écailles, blanchie et était classée 60/90, i.e. 60 à 90 crevettes par livre.

#### **2.5.3.1 Préparation, contamination artificielle et stérilisation des échantillons de crevette entière**

La préparation des échantillons débutait par la décongélation d'un bloc de crevettes pesant environ 2,0 kg. Ce bloc, débarrassé de son emballage était transféré sous conditions aseptiques dans un contenant stérile d'acier inoxydable perforé, celui-ci était placé dans un bac de plastique, également stérile, qui retenait le jus dégagé durant la décongélation. Par la suite, le tout était couvert d'un sac de plastique stérile et transporté dans la chambre froide à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  pour y rester entre 18 et 24 heures permettant ainsi la décongélation complète du bloc. Après ce temps, à l'aide d'ustensiles de cuisine, de pinces et de lames de bistouri stériles, chaque crevette, selon leur grandeur, était sectionnée en deux ou trois morceaux, et 300 grammes de ceux-ci étaient placés dans des pots stériles de 500 mL. Les pots étaient hermétiquement fermés et gardés, entourés de glace concassée, dans la chambre froide à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'au moment de la stérilisation à 25 kGy (*Under Water Calibrator / UC-15 / Nordion International Inc., Canada*). Les pots fermés contenant les morceaux de crevette étaient placés dans un béccher (1000 mL) que l'on remplissait de glace concassée. Le béccher était isolé d'une couche de styromousse

de 2,5 cm d'épaisseur, appuyé sur une base de styromousse de 6,3 cm d'épaisseur et couvert d'un couvercle également en styromousse ayant 2,0 cm d'épaisseur. La stérilité du contenu de chaque pot de crevette était vérifiée sur GTS-EL incubée à 35°C durant 48 heures et à 22°C durant 7 jours. Pour ce faire, on étalait, en duplicata, des aliquotes de 0,1 mL d'une suspension 1:10 de la crevette en solution physiologique sur la gélose. Les pots étaient scellés à nouveau et entreposés à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Deux jours avant leur utilisation, les pots étaient transférés, pour décongélation, dans la chambre froide à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ .

La contamination artificielle était faite par le trempage durant une minute de 800 grammes de morceaux de crevette dans 1600 mL d'une suspension en solution physiologique de *L. monocytogenes*. La suspension cellulaire contenait de  $1,0 \times 10^8$  à  $5,0 \times 10^8$  ufc/mL. Suite au trempage et afin d'éliminer le maximum de liquide possible, les morceaux de crevette étaient mis à égoutter, de façon sécuritaire, dans la chambre froide. Par la suite, deux séries de 18 échantillons étaient préparées en transférant 20 g de morceaux de crevette dans des tubes coniques (T4158-50R, B-D Company, États-Unis) et en les centrifugeant à 3100 rpm durant une minute. On a fait appel à la centrifugation, qui nous a permis de garder constant le niveau d'échantillon dans les tubes. Une série de tubes était gardée à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  durant une nuit, tandis que l'autre était placée dans la chambre de stockage à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$  durant le même temps. Le lendemain, les deux séries étaient traitées par l'ionisation.

### 2.5.3.2 Préparation, contamination artificielle et stérilisation des échantillons de crevette homogénéisée

À l'intérieur d'une hotte à flux laminaire et sous conditions aseptiques, nous enlevions l'emballage du bloc de crevettes congelées, qui était par la suite fragmenté en plusieurs petits morceaux dans le but de faciliter l'opération de broyage ultérieure. Celle-ci fut réalisée à l'aide d'un mélangeur (Osterizer 648-38, Sunbeam Corporation Ltd, Canada). La crevette dûment broyée était alors transférée dans des pots stériles. Ceux-ci, contenant environ 300 g de crevette homogénéisée, étaient gardés, entourés de glace concassée, dans le réfrigérateur ( $2 \pm 2^\circ\text{C}$ ) jusqu'au moment de la stérilisation à 25 kGy dans l'irradiateur UC-15. La stérilité de la crevette était vérifiée tel que décrit dans la section 2.5.3.1, puis les pots étaient entreposés à  $-22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  jusqu'à leur utilisation. Deux jours avant celle-ci, les pots étaient transférés dans le réfrigérateur pour la décongélation.

On transférait dans un sac de plastique Stomacher stérile (Seward Medical UAC House, Angleterre) 300 grammes de crevette homogénéisée et décongelée. Suite à cela, on ajoutait 3 mL d'une suspension de cellules de *L. monocytogenes*, préparée dans la solution physiologique, tel que décrit dans la section 2.5.2. Cette préparation était alors mélangée dans un Stomacher (Lab-blender 400, modèle BA 6021 de Seward Medical UAC House, Angleterre) durant 2 minutes. La texture pâteuse du mélange permettait une distribution homogène de *L. monocytogenes* dans la crevette, ce qui fut vérifié par dénombrement direct des ufc/mL sur de la GTS-EL.

On préparait deux séries de 18 échantillons en transférant 3 grammes de crevette

homogénéisée, artificiellement contaminée, dans des tubes coniques de 15 mL. Après centrifugation à 3100 rpm durant 1 minute, une série de tubes était gardée à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$  durant une nuit, tandis que l'autre était placée dans la chambre de stockage à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$  pour le même temps.

## 2.6 TRAITEMENTS IONISANTS

Les tubes contenant les suspensions de *Listeria monocytogenes* dans du BTS-EL, dans la solution physiologique, dans la crevette entière et dans la crevette homogénéisée étaient exposés à l'ionisation, produite de façon continue par la source de  $^{60}\text{Co}$  d'un irradiateur (Gammacell 220, Nordion International Inc., Canada).

La radiorésistance des trois souches de *L. monocytogenes* en phase exponentielle et en début de la phase stationnaire de croissance dans du BTS-EL fut déterminée à  $0^\circ\text{C}$ . Les doses moyennes du traitement étaient de: 0,0, 0,3, 0,7, 1,1 et 1,5 kGy. On a utilisé les mêmes quatre milieux gélosés (voir 2.4) pour dénombrer les cellules survivant aux traitements ionisants. Dans les études sur la radiosensibilité, la DRD d'un micro-organisme donnée est indirectement mesurée par le dénombrement des cellules qui résistent aux effets.

La détermination de la radiorésistance de la souche FDA-1A1 de *L. monocytogenes* en début de la phase stationnaire de croissance dans la solution physiologique eut lieu à  $0^\circ\text{C}$  et à  $-20^\circ\text{C}$ . Les doses du traitement ionisant étaient de: 0,00, 0,15, 0,30, 0,45 et 0,60 kGy quand la détermination se faisait à  $0^\circ\text{C}$  et de 0,00, 0,30, 0,60, 0,90 et 1,20 kGy

quand la détermination se faisait à -20°C. Pour cette expérience, on n'a utilisé que la GTS-EL qui permettait de récupérer plus de cellules lors de la détermination de la DRD des souches sur bouillon de culture.

La radiorésistance des souches FDA-1A1 et ATCC 19115 en début de la phase stationnaire de croissance dans la crevette homogénéisée fut déterminée à 0°C et à -20°C. À ce moment-ci, nous avons déjà observé que les souches étaient plus radiorésistantes lorsqu'elles étaient au début de la phase stationnaire. Pour la souche FDA-1A1, les doses du traitement ionisant étaient de: 0,00, 0,30, 0,60, 1,00 et 1,40 kGy à 0°C et de 0,00, 0,70, 1,50, 2,50 et 3,50 kGy à -20°C. Pour la souche ATCC 19115, les doses du traitement ionisant étaient de: 0,00, 0,30, 0,60, 0,90 et 1,20 kGy à 0°C et de 0,00, 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 et 3,00 à -20°C. Pour cette expérience, on n'a utilisé que les deux géloses, GTS-EL et Oxford qui permettaient une meilleure récupération de cellules stressées par le rayonnement ionisant lors de la détermination de la DRD sur bouillon de culture.

Finalement, on a déterminé la radiorésistance de la souche FDA-1A1 en début de la phase stationnaire de croissance dans la crevette entière à la température de 0°C. Les doses du traitement ionisant étaient de: 0,00, 0,30, 0,60, 0,90 et 1,20 kGy. Pour la même raison citée précédemment, dans cette expérience, on a également utilisé les milieux GTS-EL et Oxford.

La méthodologie de travail fut la même dans toutes les expériences de détermination de la radiorésistance des souches de *L. monocytogenes*. Pour chaque

expérience, on choisissait au hasard, parmi les 18 tubes d'échantillons, trois tubes témoins qui servaient à la détermination de la population moyenne initiale. Parmi les 15 tubes d'échantillon restants, on choisissait quatre ensembles de trois tubes chacun pour être soumis aux différentes doses du rayonnement ionisant.

Trois tubes étaient placés dans la rangée la plus interne d'un support en résine acrylique, en forme de cylindre creux (5 cm d'hauteur par 9,5 cm de diamètre), de parois très minces ( $\approx 2\text{mm}$ ) et renfermant 2 rangées de 6 trous concentriques. Le tout était transféré dans le bécher d'un litre, isolé par une couche de styromousse tel que décrit dans la section 2.5.3.1 . Lorsqu'il s'agissait de la détermination de la radiorésistance à  $0^\circ\text{C}$ , on remplissait le bécher isolé avec de la glace concassée. Pour garantir une température de  $-20^\circ\text{C}$ , le bécher était rempli avec un mélange réfrigérant constitué d'une partie de chlorure de sodium (NaCl) et de trois parties de glace concassée. Afin de stabiliser la température des échantillons, ceux-ci étaient sortis du congélateur ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) et plongés dans le mélange réfrigérant ou dans la glace concassée, selon la température désirée, une heure avant le traitement. Pour minimiser les fuites de chaleur du contenant isolé, les manipulations étaient effectuées, soit à l'intérieur du réfrigérateur (DRD à  $0^\circ\text{C}$ ), soit dans le congélateur (DRD à  $-20^\circ\text{C}$ ). Après le traitement des échantillons, on préparait des dilution décimales dans de l'eau physiologique pour ensemercer les géloses en duplicata. Après l'étalement, les boîtes de Pétri étaient incubées durant 48 heures (voir conditions d'incubation indiquées dans la section 2.4). On utilisait les dénombrements des boîtes de Pétri ayant entre 30 et 300 colonies, inclusivement, afin de



déterminer la Dose de Réduction Décimale (DRD).

Pour le calcul de cette valeur, nous nous sommes servis du même logiciel graphique qui a été défini dans la section 2.4. Le logiciel trace, sur une échelle semi-logarithmique, les courbes de destruction de la population microbienne résultant du traitement ionisant. Ce calcul est fait à partir de la portion droite de chaque courbe obtenue par régression linéaire et la DRD est représentée par l' équation:

$$DRD = \frac{-1}{\text{Pente}}$$

qui dérive elle-même de la formule suivante,

$$DRD = \frac{\text{Dose d'irradiation utilisée}}{\log(\text{pop. initiale}) - \log(\text{pop. survivante})}$$

Grâce aux caractéristiques isolantes du contenant et aux courts laps de temps que durent ceux-ci, on n'observe aucun changement de température durant le traitement. Les doses du traitement, traduites en temps d'exposition des échantillons au rayonnement ionisant, étaient obtenues automatiquement par un programme développé à l'aide du logiciel Lotus 123. Ce programme fut préparé par M. Robert Lalonde de la compagnie Nordion International Inc., Canada. Pour connaître les temps d'exposition des échantillons au rayonnement gamma, il s'agissait tout simplement d'entrer la date de la journée d'irradiation et les doses de traitement voulues.

## **2.7 DOSIMÉTRIE**

Puisqu'il fallait s'assurer que la dose reçue par les échantillons correspondait à la dose que nous avons préalablement fixée, on a sollicité et obtenu la collaboration d'un spécialiste en dosimétrie, M. Robert Lalonde de la compagnie Nordion International Inc..

Le système dosimétrique utilisé a été celui des dosimètres Fricke. La dosimétrie a été effectuée dans le même contenant isolé (voir 2.5.3.1) que nous avons utilisé durant toutes nos expériences. Les dosimètres étaient placés dans les tubes (voir 2.5.1) utilisés pour mettre les échantillons. Le débit de dose de l'irradiateur Gammacell 220 était de 2,586 kGy/heure. La calibration fut effectuée le 29 juillet 1990.

## **2.8 COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE DÉPISTAGE**

### **2.8.1 Préparation, contamination artificielle et traitement des échantillons de crevette**

La souche que nous avons choisi pour l'étude comparative fut la souche ATCC 19115, de sérotype 4b, qui s'est avérée la plus radiorésistante des trois souches étudiées.

La crevette congelée (voir 2.5.3) a été broyée à l'aide d'un mélangeur, et transférée dans des pots à bouchons vissés, stériles, de manière à composer quatre lots, chacun pesant 300 grammes. Ces pots ont été entreposés dans le congélateur à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$  durant au moins 48 heures.

Afin de permettre la décongélation du contenu d'un lot de crevette, un des pots était transféré dans la chambre froide ( $2 \pm 2^\circ\text{C}$ ), deux jours avant le début des

manipulations. À l'intérieur de la hotte à flux laminaire, le contenu du pot décongelé était alors transféré dans un sac Stomacher 400 et le tout était homogénéisé dans le Stomacher pendant 2 minutes. Après cette première homogénéisation, un échantillon de 30 g, codé A, était transféré dans un tube conique (Falcon 45 mL) stérile et gardé au réfrigérateur. Le restant du lot était contaminé artificiellement avec 1% d'une suspension ( $\approx 10^6$  ufc/mL) d'une culture de travail (ATCC 19115) fraîche, diluée dans l'eau peptonée 0,1%. Après les 2 minutes d'homogénéisation dans le Stomacher, 5 échantillons, codés B-C-D-E-F, de 30 grammes chacun, étaient transférés dans des tubes coniques stériles. Ces 5 échantillons et l'échantillon A étaient gardés au réfrigérateur.

Puisque la texture de la crevette homogénéisée était pâteuse, nous avons centrifugé à 3100 rpm durant 2 min.) afin d'égaliser leur niveau. Après cette opération, les 6 tubes étaient transférés dans le congélateur à  $-22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le lendemain, les tubes C, D, E et F étaient placés dans le support isolé (voir 2.5.3.1), qu'on remplissait avec le mélange réfrigérant (1 partie de NaCl mélangée à 3 parties de glace concassée), une heure avant le début du traitement ionisant (UC-15). Pendant l'heure qui précédait le traitement, le contenant isolant était gardé dans le congélateur afin d'empêcher la perte de chaleur. Les doses appliquées furent de 5,0 kGy la première semaine, de 4,0 kGy la deuxième, de 3,5 kGy la troisième et de 2,5 kGy la dernière semaine de l'expérience.

Les doses du traitement: 2,5, 3,5, 4,0 et 5,0 kGy, furent ainsi choisies en fonction de plusieurs études de détermination de la radiorésistance de *L. monocytogenes* réalisées par d'autres chercheurs et aussi en raison de la dose maximale permise en France pour le

traitement de la crevette congelée à -18°C.

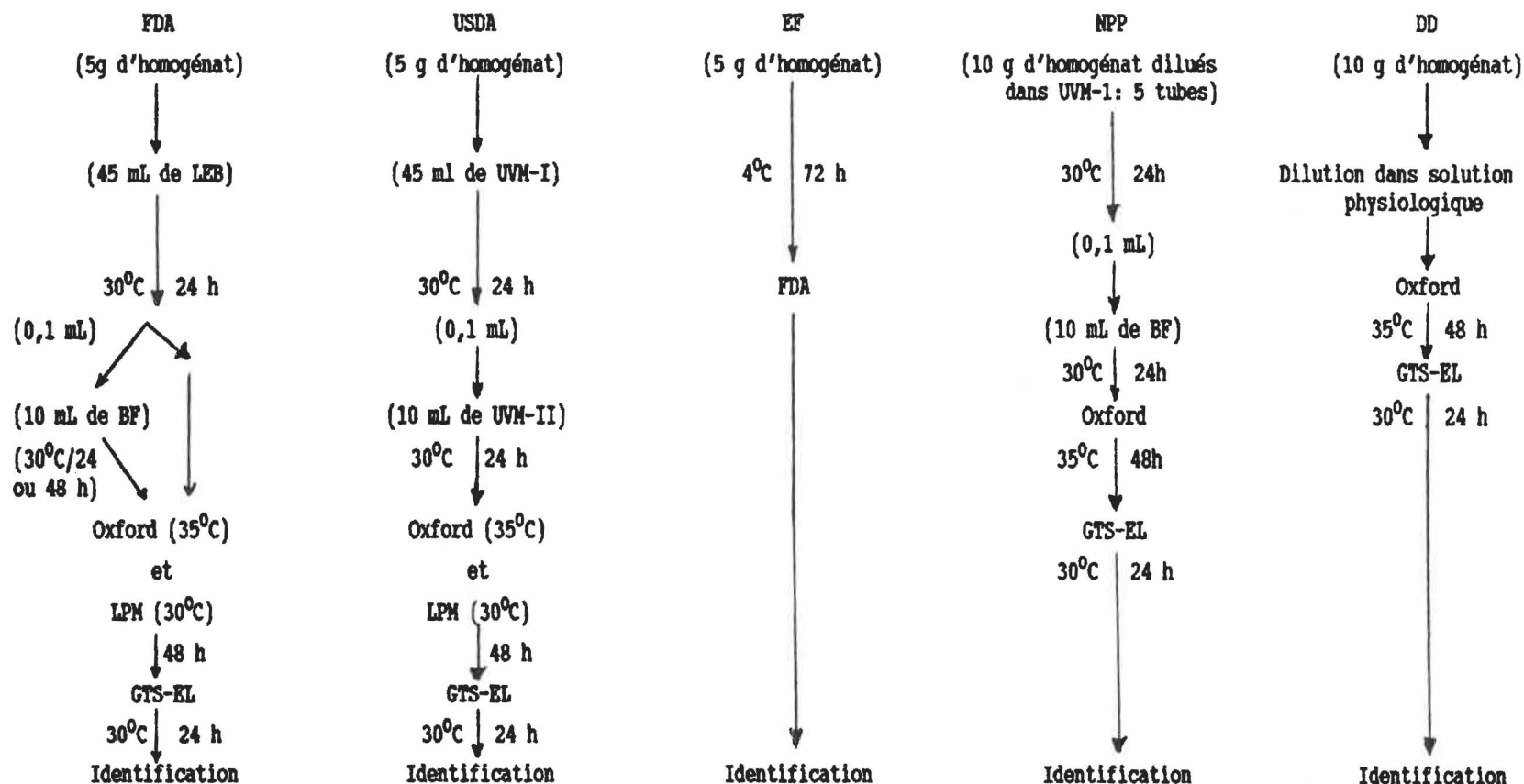
Suite à l'ionisation, les échantillons C, D, E et F, puis les échantillons A et B non traités, étaient mis à décongeler dans le réfrigérateur à  $2 \pm 2^\circ\text{C}$ . Le lendemain, chacun des échantillons A, B, C, D, E et F étaient subdivisés en 4 sous-échantillons: 3 sous-échantillons de 5 grammes et 1 échantillon de 10 grammes. Les trois sous-échantillons pesant 5 grammes servaient pour le dépistage de *L. monocytogenes* par la méthode FDA, USDA et EF, alors que celui de 10 grammes était destiné au dénombrement effectué soit par la méthode NPP (échantillons A, C, D, E et F), soit par la méthode du Dénombrement Direct (échantillon B). Un schéma des étapes comprenant chaque méthode se trouve à la page 80.

À l'aide des méthodes de dépistage FDA, USDA, EF et des techniques du Dénombrement Direct (DD) et du NPP, nous avons isolé, à partir des sous-échantillons de crevette, 403 cultures que nous avons transférées et purifiées sur gélose GTS-EL. Les cultures pures ont été ultérieurement identifiées à *L. monocytogenes* à l'aide des épreuves proposées par Warburton et Farber (1990):

- hémolyse sur gélose sang [Base de gélose au sang (Oxoid # 2) avec 7% de sang défibriné de cheval obtenue de Quélab, Canada];
- mobilité dans un montage humide, dans le milieu SIM (BBL, Canada);
- catalase et coloration de Gram;
- fermentation du mannopyranoside, du mannitol, du rhamnose et du xylose (Biopharm, Canada);

- fermentation du culot et de la surface inclinée du milieu TSI (triple sugar-iron, BBL);
- réaction Méthyl Rouge/Voges-Proskauer;
- test de CAMP.

Vingt des 403 présumés isolats, choisis au hasard, ont été également identifiés comme étant du *L. monocytogenes* par le test rapide MICRO-ID (Organon Teknika Corporation, États-Unis). En même temps, ces 20 isolats, repiqués dans une gélose sang, ont été envoyés au Laboratoire de Santé Publique du Québec, situé à Sainte-Anne-de-Bellevue, pour une confirmation parallèle du genre et de l'espèce.

FIGURE 2a) Schéma des différentes étapes du protocole de recherche pour l'isolement et le dénombrement de *L. monocytogenes*.

Légendes: FDA (Food and Drug Administration); USDA (United States Department of Agriculture); EF (Enrichissement au Froid); NPP (Nombre le Plus Probable); DD (Dénombrement direct); LEB (Listeria Enrichment Broth); BF (Bouillon Fraser); GTS-EL (Gélose Trypticase Soya-Extrait de Levure); UVM-I (bouillon Université du Vermont-I); UVM-II (bouillon Université du Vermont-II).

### 3 - RÉSULTATS

La présentation des résultats respecte la séquence des expériences telle que prévue dans le projet de recherche. On a voulu, dans la première étape, établir les courbes de croissance des trois souches de *Listeria monocytogenes* afin de déterminer les moments propices à la récolte des cellules en phase logarithmique ou en début de la phase stationnaire de croissance. L'étude de leur radiorésistance constitue le sujet de la deuxième étape. À partir des données des ces deux étapes, nous avons finalisé le projet par une comparaison de méthodes de dépistage de *L. monocytogenes* dans la crevette artificiellement contaminée, puis soumise au rayonnement ionisant.

#### **3.1 COURBES DE CROISSANCE**

Les courbes de croissance ont été établies tel que décrit en 2.4 . Les cellules se multipliaient dans le BTS-EL gardé à 30°C sous agitation (180 rpm) et étaient récupérées sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam. Les Figures 3a, 3b et 3c représentent, respectivement, les courbes de croissance des souches ATCC 19115, ATCC 19111 et FDA-1A1. Telle qu'elle est représentée par les Figures 3a, 3b et 3c, la population initiale de cellule de chacune des souches dans le bouillon BTS-EL variait de  $5,2$  à  $7,3 \times 10^6$  ufc/mL pour la souche 19115, de  $4,5$  à  $5,9 \times 10^7$  ufc/mL pour la souche 19111 et de  $4,1$  à  $5,2 \times 10^7$  ufc/mL pour la souche FDA-1A1.

Nous pouvons constater à l'analyse des trois Figures que les géloses sélectives ont permis une aussi bonne récupération des souches que l'a permise la gélose non sélective

GTS-EL. Toutefois, la gélose Palcam s'est avérée fortement inhibitrice pour la souche 19111. Ce qui explique l'absence de la courbe pour la souche récupérée sur cette gélose. Les temps de génération (G) obtenus furent de  $\approx 44$  min. pour la souche 19115,  $\approx 48$  min. pour la souche 19111 et de  $\approx 50$  min. pour la souche FDA-1A1. Les valeurs de G ont été déterminées à partir de la droite de régression linéaire tracée selon les points générés par les décomptes obtenus sur la gélose non sélective GTS-EL. Nous nous sommes servi du logiciel graphique Sigmaplot pour tracer ces droites de régression.



**FIGURE 3a)**

Courbes de croissance de la souche 19115 cultivée dans le BTS-EL à 30°C et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam. La ligne droite représente la droite de régression tracée à partir des décomptes effectués sur le milieu GTS-EL. Chacun des points représente la moyenne arithmétique de trois déterminations  $\pm$  l'écart type.

FIGURE 3a)

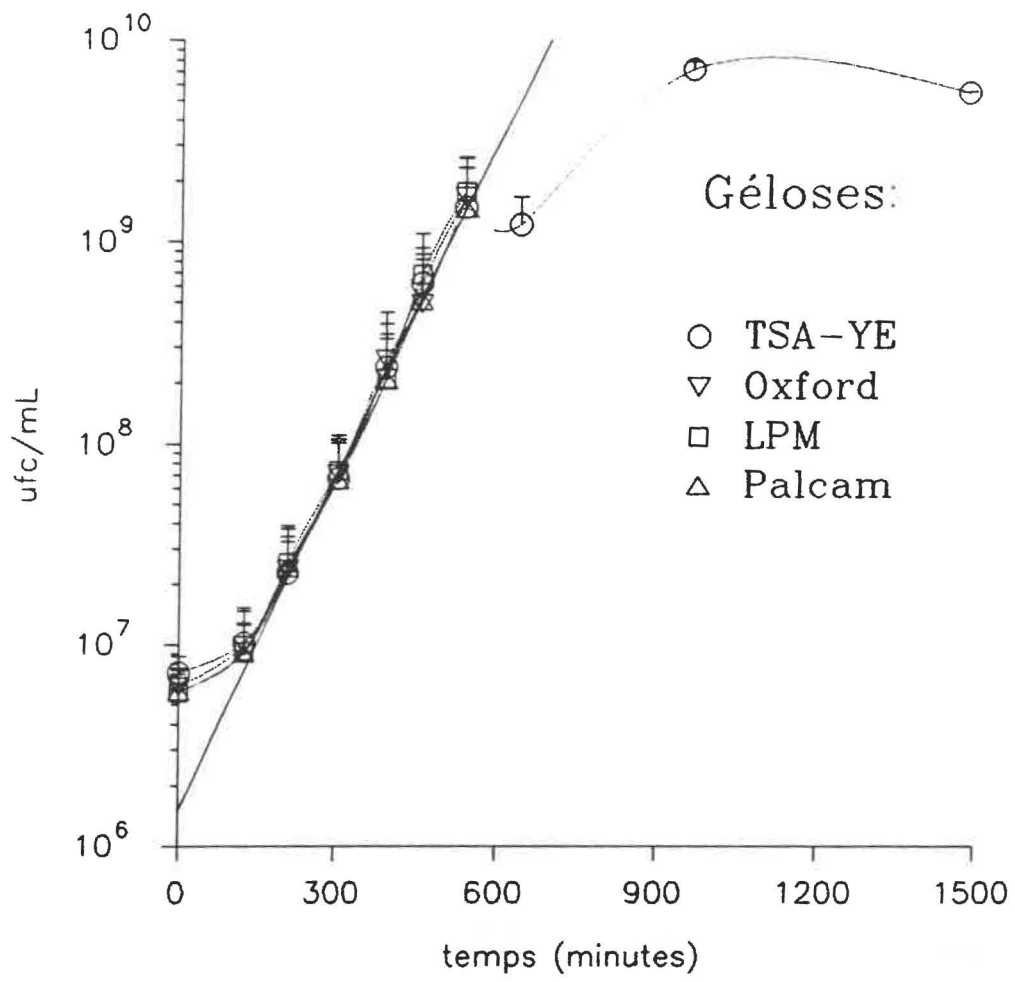
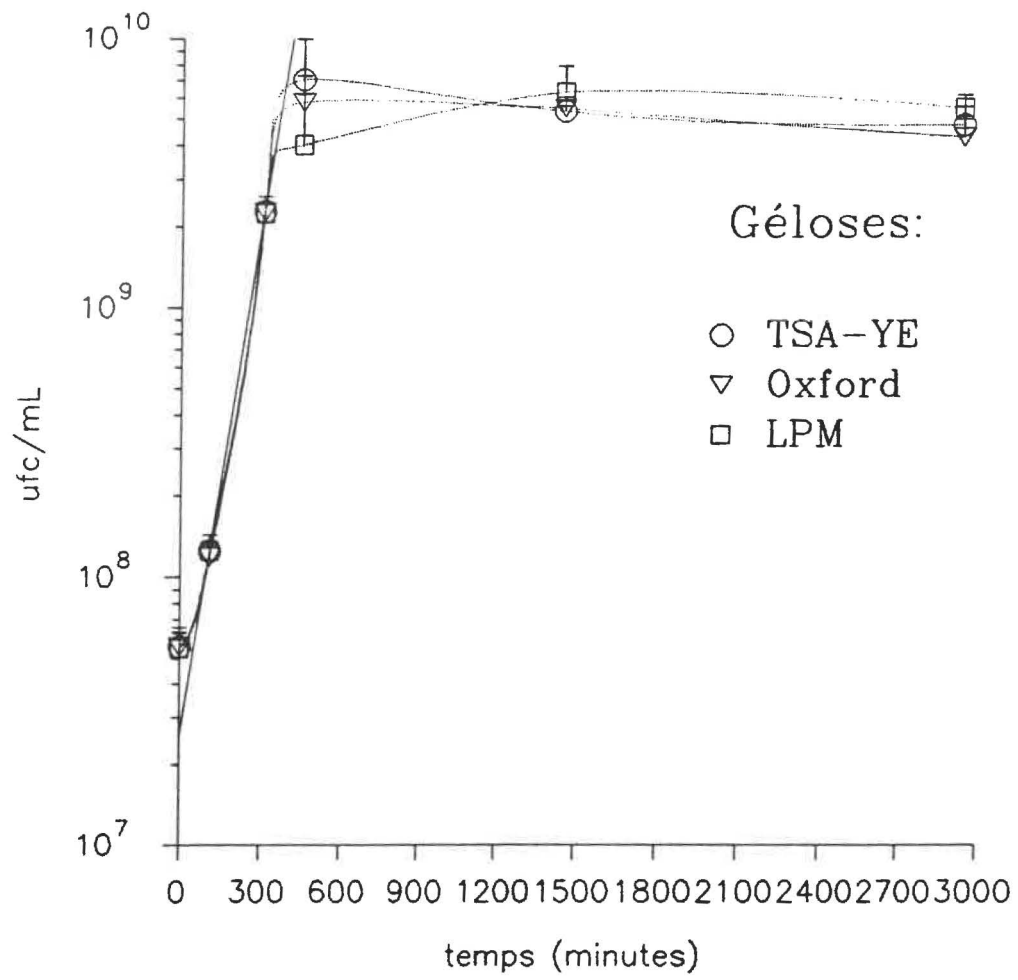




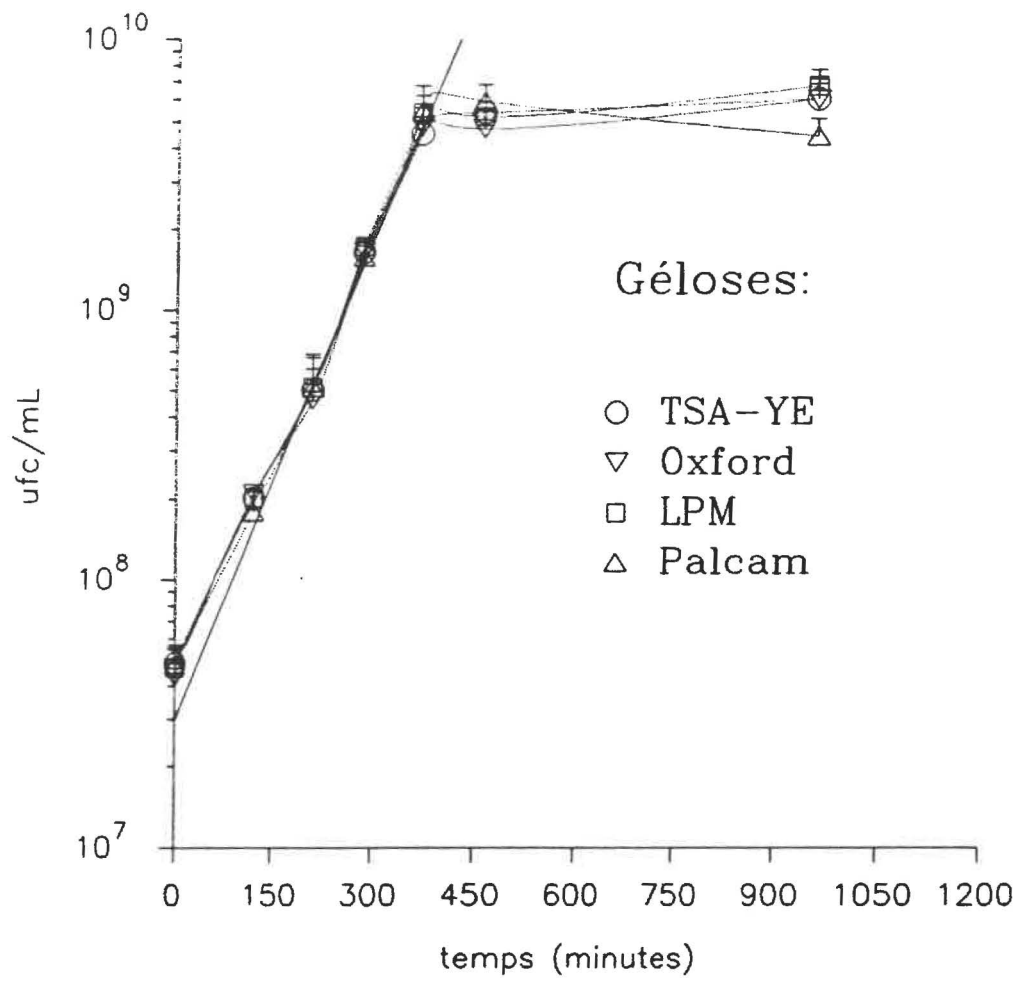
FIGURE 3b)



**FIGURE 3c)**

Courbes de croissance de la souche FDA-1A1 cultivée dans le BTS-EL à 30°C et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam. La ligne droite représente la droite de régression tracée à partir des décomptes effectués sur le milieu GTS-EL. Chacun des points représente la moyenne arithmétique de trois déterminations  $\pm$  l'écart type.

FIGURE 3c)



### 3.2 ÉTUDE DE LA RADIORÉSISTANCE

Les Figures 3d et 3d', 3e et 3e', 3f et 3f', 3g et 3g', 3h et 3h' et 3i et 3i' représentent, respectivement, les courbes de réduction de la population et les droites de régression linéaire obtenues pour les souches 19115, 19111 et FDA-1A1 en phase exponentielle et en début de la phase stationnaire de croissance, exposées au rayonnement ionisant dans le BTS-EL à 0°C. Pour toutes les droites de régression, on constate que la gélose LPM fut celle qui permettait de récupérer le plus petit nombre de cellules provenant des échantillons ionisés, ce qui s'est traduit par des valeurs de DRD plus petites. Les valeurs de la DRD obtenues pour les souches récupérées sur la gélose Oxford ne sont pas significativement différentes de celles obtenues à l'aide des décomptes effectués sur la gélose non sélective GTS-EL (Tableaux 3-I et 3-II). Lorsque l'on a utilisé la gélose Palcam (phase stationnaire), on observe sa faible capacité de récupérer les cellules abîmées par le traitement ionisant. C'est la raison pour laquelle la gélose Palcam a été abandonnée lors des études ultérieures.

Sur les Tableaux 3-I et 3-II, sont présentées les valeurs de la DRD obtenues pour les trois souches, en phase exponentielle et début de la phase stationnaire, traitées dans le BTS-EL à 0°C. Les résultats ont été analysés statistiquement à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Inc., Chicago, 1990). On observe que parmi les milieux dits sélectifs, le milieu Oxford est celui qui permet une meilleure récupération des cellules, en phase exponentielle ou en début de la phase stationnaire de croissance, abîmées par le rayonnement gamma.

Nous nous sommes inspirés des travaux effectués par Huhtanen et collaborateurs (1989) portant sur la détermination de la radiorésistance de plusieurs souches de *L. monocytogenes* traitées dans le bouillon nutritif et dans le poulet, pour préparer le Tableau 3-III. L'analyse de ce Tableau révèle que les courbes de survie de *L. monocytogenes* traitée dans le BTS-EL ne sont pas linéaires, donc que la radiorésistance des souches peut varier selon l'intensité de la dose. Les souche FDA-1A1 et 19111 se sont généralement montrées moins susceptibles aux effets occasionnés par les doses inférieures à 0,7 kGy que par celles variant entre 0,7 et 1,5 kGy. Au contraire, la souche 19115 s'est avérée plus susceptible à de tels effets lorsque les doses étaient inférieures à 0,7 kGy. On a observé également que la composition de la gélose utilisée pour récupérer les cellules irradiées pouvait jouer un rôle important, car la DRD de la souche FDA-1A1 qui, déterminée entre 0,0 et 0,7 kGy, était de 0,602 kGy avec GTS-EL, descendait à 0,435 kGy avec la gélose Oxford, pour diminuer davantage à 0,291 kGy avec la gélose LPM. On confirme également cet événement pour la souche 19115 traitée entre 0,7 et 1,5 kGy. Les moyennes des DRD des trois souches récupérées sur GTS-EL sont de: 0,474 kGy lorsque le traitement variait de 0,0 à 0,7 kGy, de 0,361 kGy lorsqu'il variait de 0,7 à 1,5 kGy et de 0,409 kGy lorsqu'on a considéré l'intervalle de 0,0 à 1,5 kGy.

Le Tableau 3-IV montre l'influence de l'environnement sur la radiorésistance de la souche FDA-1A1. La radiorésistance la plus faible est obtenue dans la solution physiologique. La crevette n'apporte aucune protection supplémentaire contre les effets des rayonnements ionisants à la souche, par comparaison aux résultats obtenus avec le



BTS-EL. Cette même constatation peut être faite lorsqu'on compare les valeurs de la radiorésistance de la souche 19115 traitée dans BTS-EL et dans la crevette (voir Tableau 3-V).

Dans le Tableau 3-VI, on retrouve les valeurs de la radiorésistance déterminées pour les souches 19115 et FDA-1A1 en début de phase stationnaire contaminant la crevette traitée au rayonnement gamma à 0 et à -20°C. On observe qu'une réduction de la température de traitement conduit à une augmentation de la radiorésistance d'environ 2,4 fois.

**FIGURE 3d)** Courbes de réduction de la population de la souche 19115 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3d')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19115 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

FIGURE 3d)

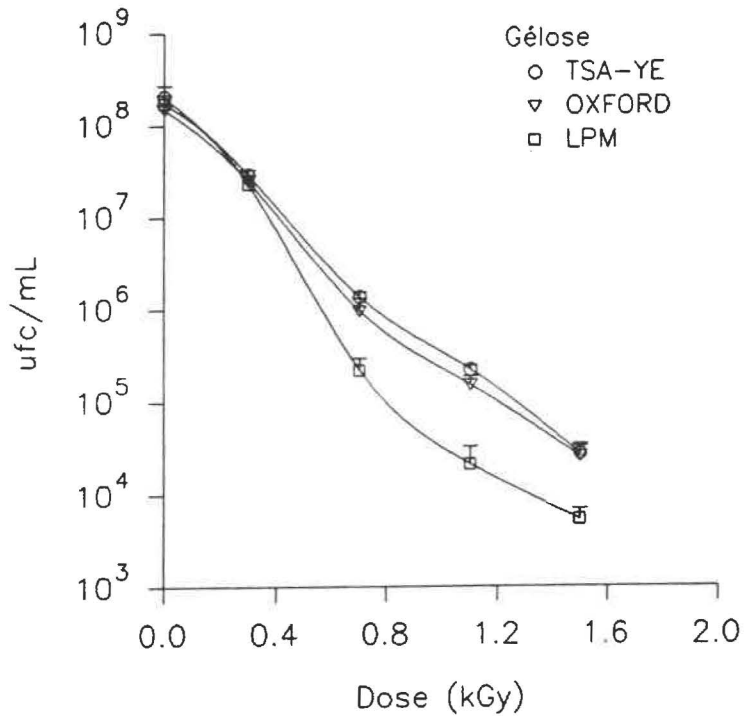
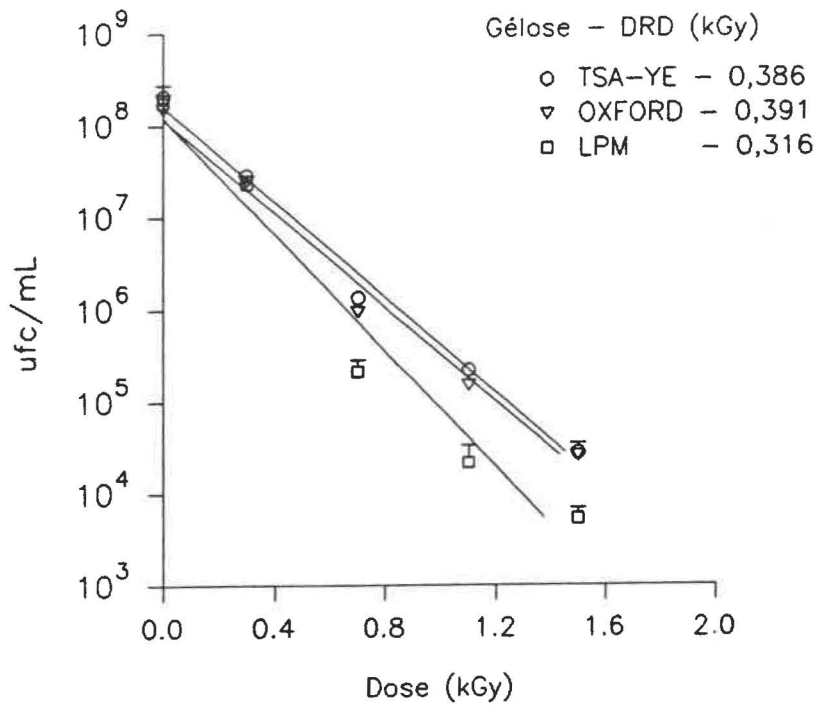


FIGURE 3d')



**FIGURE 3e)** Courbes de réduction de la population de la souche 19115 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée par quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.

**FIGURE 3e')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19115 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

FIGURE 3e)

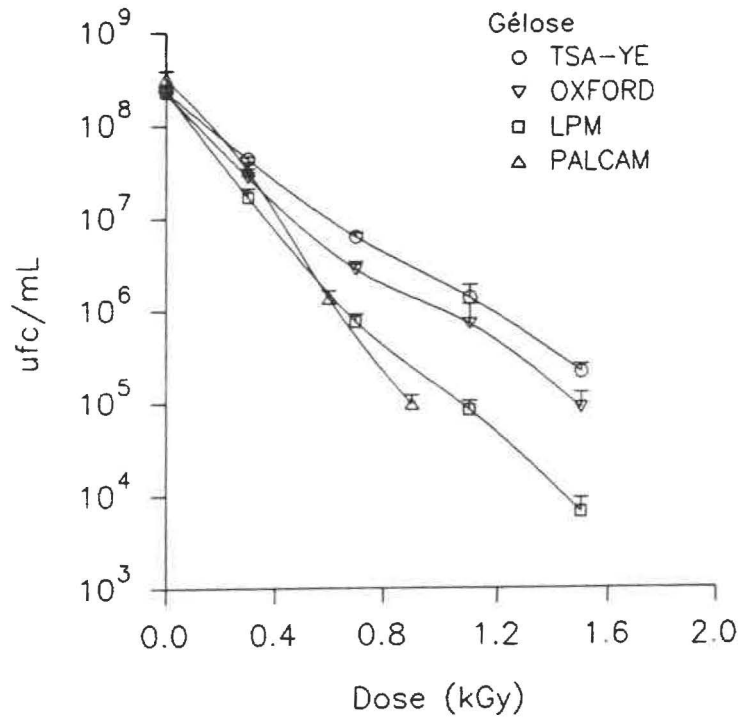
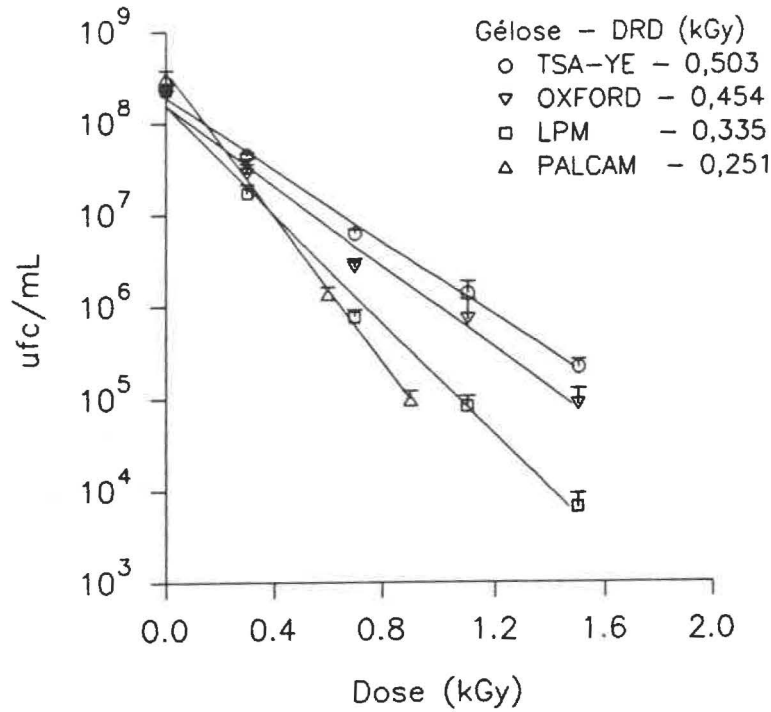


FIGURE 3e')



**FIGURE 3f)** Courbes de réduction de la population de la souche 19111 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3f')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19111 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

FIGURE 3f)

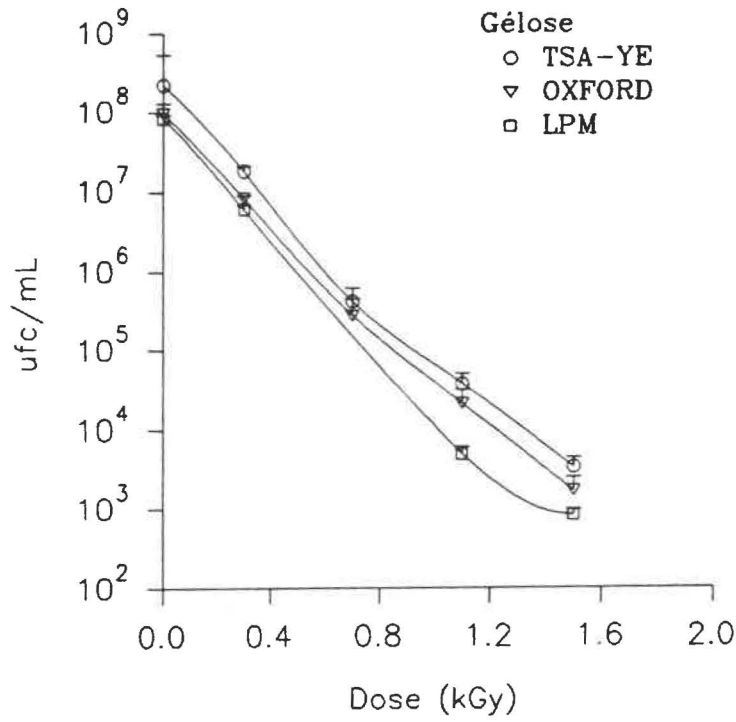
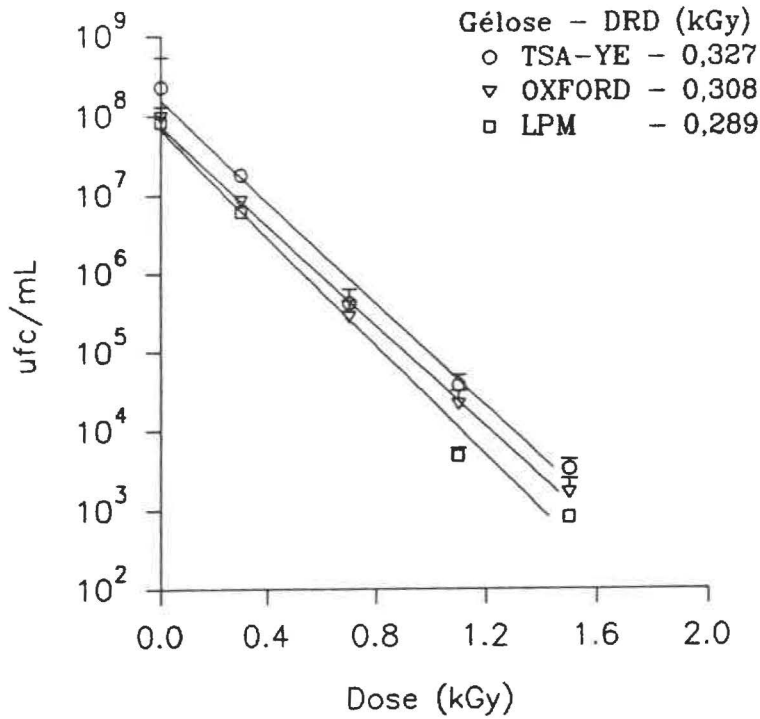


FIGURE 3f')



**FIGURE 3g)** Courbes de réduction de la population de la souche 19111 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3g')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche 19111 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.



FIGURE 3g)

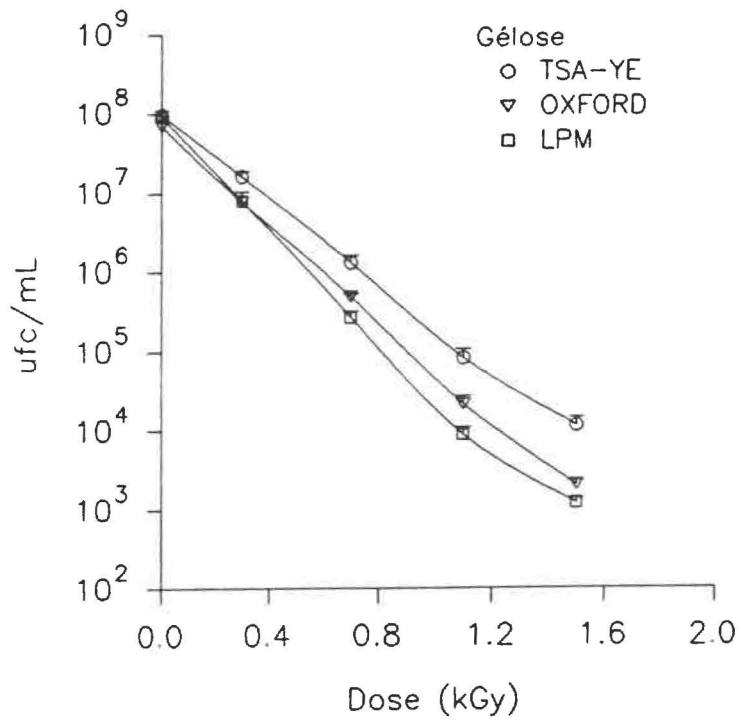
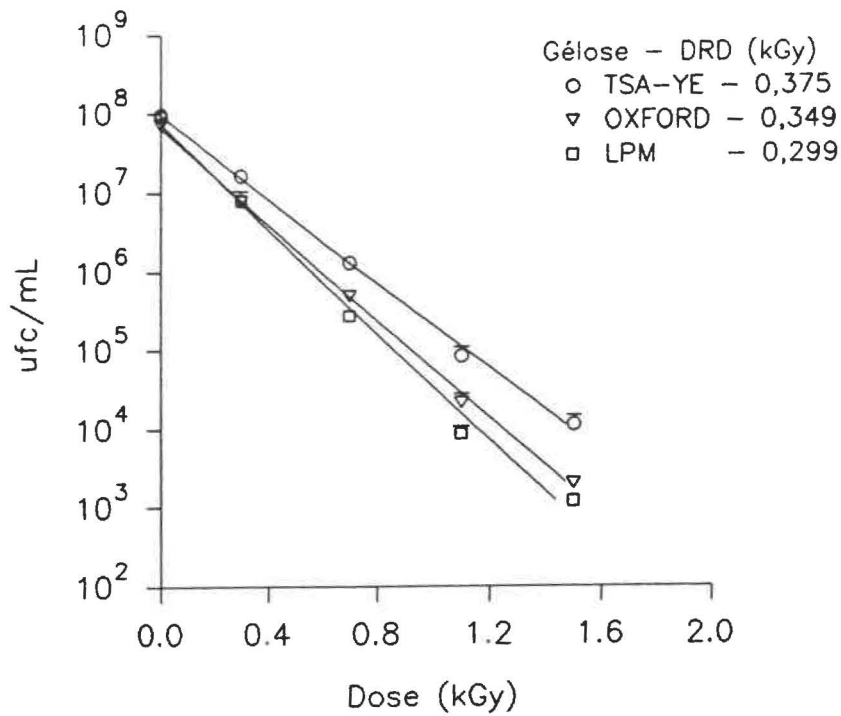


FIGURE 3g')



**FIGURE 3h)** Courbes de réduction de la population de la souche FDA-1A1 traitée en phase exponentielle à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur trois milieux: GTS-EL, Oxford et LPM.

**FIGURE 3h')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche FDA-1A1 en phase exponentielle obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

FIGURE 3h)

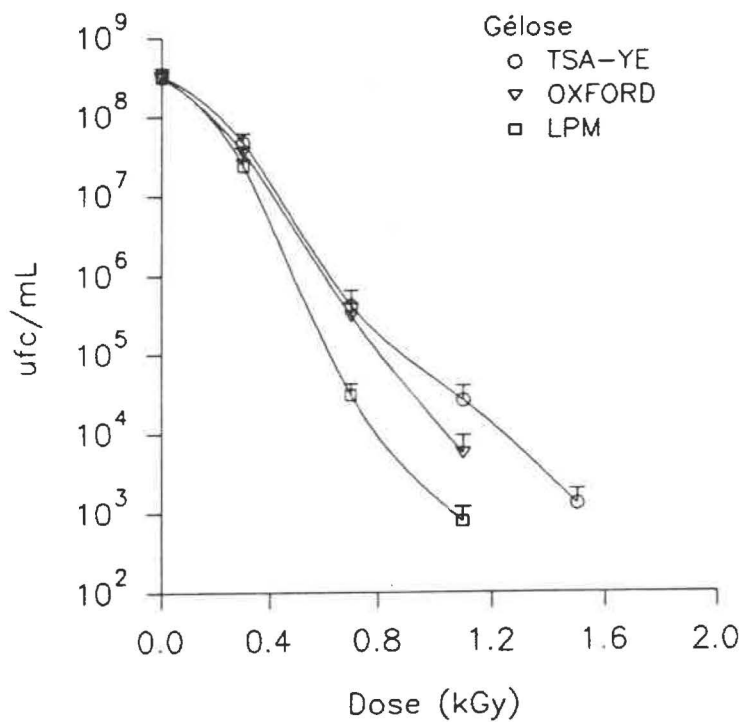
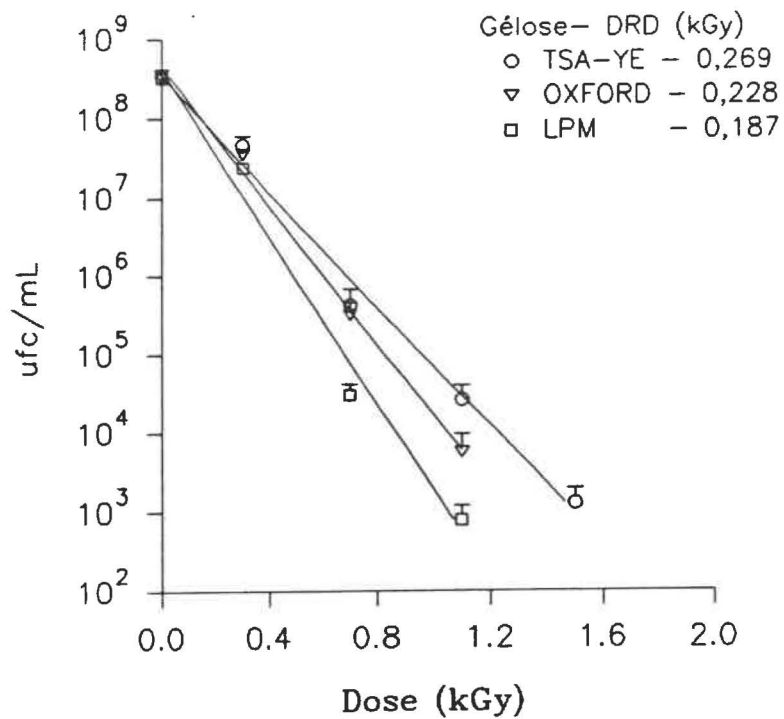


FIGURE 3h')



**FIGURE 3i)** Courbes de réduction de la population de la souche FDA-1A1 traitée en début de la phase stationnaire à 0°C dans le BTS-EL et récupérée sur quatre milieux: GTS-EL, Oxford, LPM et Palcam.

**FIGURE 3i')** Droites de régression linéaire et DRD de la souche FDA-1A1 en début de la phase stationnaire obtenues à partir des courbes de réduction de la population.

FIGURE 3i)

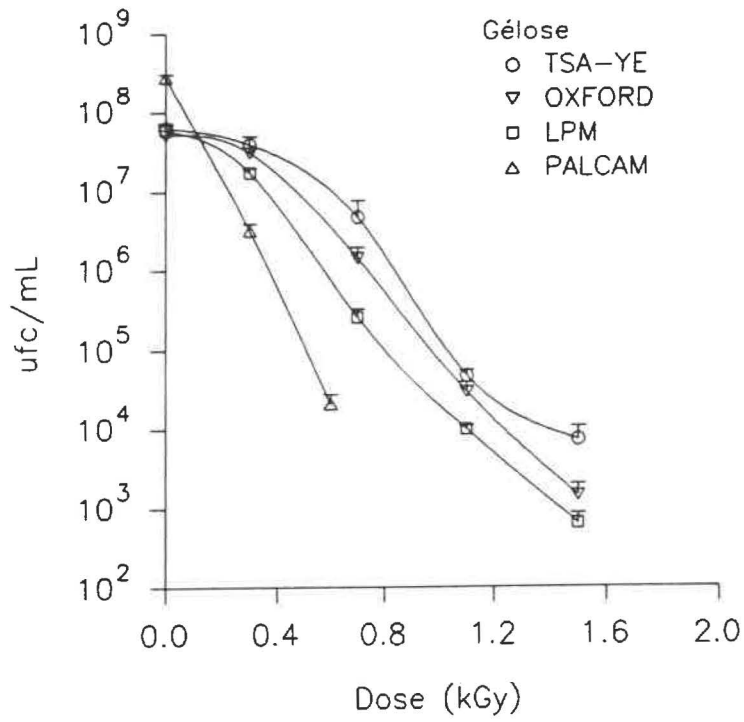
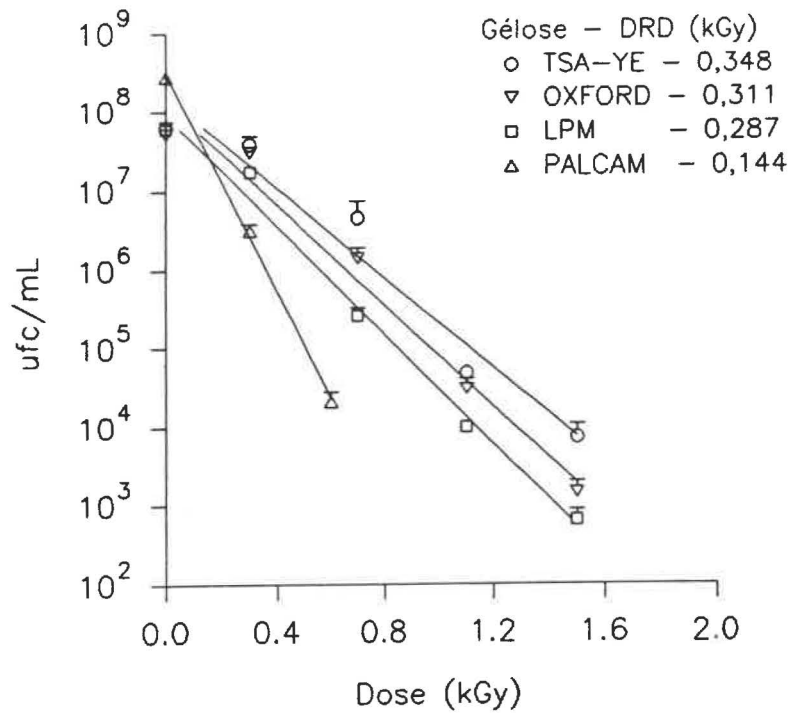


FIGURE 3i')



**TABLEAU 3-I**

Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy des souches ATCC 19115 et 19111 et FDA-1A1 traitées en phase exponentielle dans BTS-EL à 0°C et récupérées sur trois milieux gélosés.

Souche	Milieu gélosé		
	GTS-EL	Oxford	LPM
19115	0,386a*	0,391a	0,316b
19111	0,327a,b	0,308b	0,289b
FDA-1A1	0,269b	0,228b,c	0,187c

\* Les valeurs d'une même rangée (rang ou colonne) qui ne portent pas la même lettre sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLEAU 3-II**

Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy des souches ATCC 19115 et 19111 et FDA-1A1 traitées en phase stationnaire dans BTS-EL à 0°C et récupérées sur quatre milieux gélosés.

Souche	Milieu Gélosé			
	GTS-EL	Oxford	LPM	Palcam
19115	0,503a*	0,454a	0,335b,c	0,251d
19111	0,375b	0,349b,c	0,299c,d	**
FDA-1A1	0,348b,c	0,311c,d	0,287c,d	0,144e

\* Les valeurs d'une même rangée (rang ou colonne) qui ne portent pas le même lettre sont significativement différentes ( $P < 0,05$ );

\*\* Le milieu s'est avéré fortement inhibiteur pour la souche.

**TABLEAU 3-III**

Variations de la radiorésistance de *L. monocytogenes* en fonction de l'intervalle de dose de traitement et du milieu gélosé de récupération.

Souche	Gélose	Dose (kGy)					Intervalle de dose		
		0,0	0,3	0,7	1,1	1,5	0,0 à 0,7	0,7 à 1,5	0,0 à 1,5
		Log ufc/mL					DRD (kGy)		
19115	GTS-EL	8,36	7,64	6,79	6,13	5,33	0,445	0,482	0,503
19111		7,98	7,21	6,12	4,93	4,06	0,374	0,345	0,375
FDA-1A1		7,80	7,59	6,66	4,68	3,86	0,602	0,256	0,349
Moyenne		8,05	7,48	6,52	5,25	4,42	0,474	0,361	0,409
Écart type		0,29	0,24	0,36	0,78	0,79	0,095	0,175	0,082
19115	Oxford	8,35	7,45	6,43	5,85	4,94	0,367	0,466	0,454
19111		7,84	6,89	5,69	4,33	3,31	0,325	0,298	0,327
FDA-1A1		7,72	7,49	6,15	4,48	3,16	0,435	0,237	0,311
Moyenne		7,97	7,29	6,09	4,89	3,80	0,376	0,334	0,364
Écart type		0,33	0,34	0,37	0,84	0,99	0,055	0,118	0,078
19115	LPM	8,36	7,23	5,88	4,92	3,82	0,283	0,341	0,335
19111		7,97	6,89	5,43	3,95	3,08	0,276	0,303	0,299
FDA-1A1		7,77	7,24	5,41	3,99	2,81	0,291	0,271	0,287
Moyenne		8,03	7,12	5,57	4,29	3,24	0,283	0,305	0,307
Écart type		0,30	0,19	0,27	0,55	0,52	0,008	0,035	0,025

**TABLEAU 3-IV**

Comparaison des valeurs de la DRD (kGy) pour la souche FDA-1A1 traitée en phase stationnaire à 0°C dans quatre environnements d'irradiation différents.

Environnement	Milieu Gélosé	
	GTS-EL	Oxford
BTS-EL	0,348a*	0,311a,b
Crevette homogénéisée	0,266b	0,277b
Crevette entière	0,272b	0,266b
Solution physiologique	0,164c	**

\* Les valeurs d'une même rangée (rang ou colonne) qui ne portent pas la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ );

\*\* données non disponibles.

**TABLEAU 3-V**

Comparaison des valeurs de la DRD (kGy) pour la souche ATCC 19115 traitée en phase stationnaire à 0°C dans deux environnements d'irradiation différents.

Environnement	Milieu Gélosé	
	GTS-EL	Oxford
BTS-EL	0,503a*	0,454a
Crevette homogénéisée	0,355b	0,336b

\* Les valeurs d'une même rangée (rang ou colonne) qui ne portent pas la même lettre sont significativement différentes ( $p < 0,05$ );

\*\* données non disponibles.



**TABLEAU 3-VI**

Comparaison des valeurs de la DRD exprimées en kGy pour les souches ATCC 19115 et FDA-1A1 traitées en phase stationnaire à 0°C et à -20°C dans la crevette homogénéisée et récupérée sur deux milieux gélosés.

Milieu gélosé	Souche	Température	
		-20°C	0°C
GTS-EL	19115	0,840a*	0,355c
GTS-EL	FDA-1A1	0,736b	0,266d
Oxford	19115	0,811a	0,336c
Oxford	FDA-1A1	0,672b	0,277c,d

\* Les valeurs d'une même rangée (rang ou colonne) qui ne portent pas la même lettre sont significativement différentes ( $P < 0,05$ ).

### 3.3 COMPARAISON DE TROIS MÉTHODES DE DÉPISTAGE DE *L. MONOCYTOGENES*

Le Tableau 3-VII présente le nombre moyen d'ufc/g de crevette homogénéisée avant (échantillons A et B) et après traitement ionisant (échantillons C, D, E et F). Pour déterminer le niveau de contamination avant ionisation, nous avons utilisé la technique du dénombrement direct (DD). La technique utilisée, pour estimer les ufc/g des échantillons ionisés, fut celle du nombre le plus probable (NPP), puisque le nombre des ufc/g était réduit à un point tel que la technique du DD ne permettait pas de les repérer. On constate que, lorsque les échantillons furent traités à 5,0 et à 4,0 kGy, le niveau de contamination a baissé à une valeur inférieure au seuil de détection de la technique du NPP. Celle-ci a été, toutefois, assez sensible pour détecter une moyenne de 0,45 ufc de *L. monocytogenes* par gramme d'échantillon, lorsque la dose de traitement était de 3,5 kGy.

Le Tableau 3-VIII résume les résultats obtenus lors de l'utilisation des trois méthodes de dépistage de *Listeria monocytogenes*. Lorsque la dose de traitement était de 5,0 kGy, seule la méthode d'enrichissement au froid (EF) fut capable de dépister *L. monocytogenes* à partir des échantillons de crevette congelée. Au fur et à mesure que les temps d'exposition des échantillons au rayonnement ionisant furent réduits, le nombre d'échantillons qui se sont avérés positifs était plus élevé. Lors de l'étude à 4,0 kGy, les méthodes EF et USDA ont réussi à détecter de 2,5 à 3 fois plus d'échantillons contaminés que la méthode FDA. Les méthodes FDA et USDA possédaient une sensibilité semblable, lors du dépistage de *L. monocytogenes* dans les échantillons traités à 3,5, à 2,5 kGy ainsi que dans les échantillons non irradiés.

Les vingt cultures présumées de *L. monocytogenes*, que nous avons envoyées au Laboratoire de Santé Publique du Québec pour une caractérisation parallèle, ont toutes été identifiées à *L. monocytogenes*.

**TABLEAU 3-VII**

Niveau de contamination avant et après ionisation dans les échantillons de crevette homogénéisée et artificiellement contaminée avec la souche ATCC 19115.

Semaine n°	ufc/g avant*	Dose (kGy)	ufc/10 g après**
1	8,5x10 <sup>4</sup>	5,0	absence
2	7,5x10 <sup>4</sup>	4,0	absence
3	3,7x10 <sup>4</sup>	3,5	4,5
4	1,6x10 <sup>5</sup>	2,5	68,0

\* Les valeurs ont été déterminées par dénombrement direct sur gélose Oxford;

\*\* Les valeurs ont été estimées par la technique du nombre le plus probable (série de 5 tubes).

**TABLEAU 3-VIII**

Étude comparative sur l'efficacité de trois méthodes d'isolement de *L. monocytogenes* pour dépister la souche ATCC 19115 présente dans de la crevette homogénéisée, contaminée artificiellement, congelée à -20°C et traitée par rayonnement gamma.

Méthode	Dose (kGy)					
	0,0	0,0	2,5	3,5	4,0	5,0
	A	B	C/D/E/F	C/D/E/F	C/D/E/F	C/D/E/F
FDA	0/16	16/16	16/16	9/16 <sup>a</sup>	2/16	0/16
USDA	0/16	16/16	16/16	9/16	5/16	0/16
EF <sup>b</sup>	0/16	16/16	16/16	nd	6/16	1/16

A - échantillons de crevette (5 g) non contaminée et non irradiée;

B - échantillons de crevette (5 g) contaminée artificiellement et non irradiée;

C/D/E/F - échantillons de crevette (5 g) contaminée artificiellement et irradiée à différentes doses;

<sup>a</sup> - nombre d'échantillons de crevette (5 g) sur 16 qui se sont avérés positifs pour *L. monocytogenes*;

<sup>b</sup> - modifiée par MacCarthy et collaborateurs (1990);

Le niveau de contamination initial des échantillons (B) se trouve dans le Tableau 3-VII;

Débit de la source de <sup>60</sup>Co = 25 kGy/h (Underwater Calibrator - Nordion International Inc.);

nd - non disponible.

#### 4 - DISCUSSION

Les résultats présentés aux Tableaux 3-I et 3-II confirment le rapport de dépendance existant entre la valeur de la DRD et le milieu gélosé que l'on utilise pour récupérer et pour dénombrer les cellules survivant au procédé d'ionisation. Parmi les milieux gélosés sélectifs employés, le milieu Oxford est celui qui permet la récupération du plus grand nombre de cellules ionisées. Les valeurs de la DRD obtenues avec cette gélose sélective ne diffèrent pas de celles obtenues avec le milieu gélosé non sélectif GTS-EL. Le milieu LPM, dont la formulation est une variante plus sélective de la formule originale du milieu McBride grâce à l'augmentation de la quantité de chlorure de lithium et à l'ajout de l'antibiotique moxalactame, s'est avéré moins efficace que le milieu Oxford pour la récupération des cellules partiellement abîmées par l'ionisation. Finalement, c'est avec le milieu sélectif Palcam qu'on a obtenu la plus petite valeur de DRD, particulièrement, pour les souches ATCC 19115 et FDA 1A1 en phase stationnaire. Le milieu Palcam ne permettant pas la récupération de la souche 19111, nous n'avons pas pu l'employer pour la détermination de la DRD de cette souche.

Patterson (1989) qui avait déterminé la radiorésistance de quatre souches de *L. monocytogenes* isolées à partir de quatre environnements distincts à l'aide de deux milieux gélosés sélectifs et un non sélectif, a également observé que la valeur de la radiorésistance d'une souche donnée était fonction du milieu gélosé utilisé. Ses observations étaient tout à fait vraies pour les cellules survivantes de chacune des quatre souches distribuées dans une solution physiologique, mais ne s'est pas reproduit avec les

cellules récupérées à partir des échantillons de poulet irradié. Deux des quatre souches récupérées du poulet ont poussé aussi bien sur le milieu sélectif Oxford que sur le milieu non sélectif GTS-EL. Ceci peut être expliqué par le fait que les souches n'ont pas toutes ni la même radiorésistance ni la même tolérance aux composants chimiques des milieux et par le fait que l'irradiation cause beaucoup plus de dégâts aux cellules distribuées dans la solution physiologique qu'au cellules distribuées dans le poulet.

Dans une étude comparative, Netten et collaborateurs (1989) rapportent que le milieu sélectif Palcam est celui qui permet le mieux d'isoler *L. monocytogenes*, suivi par Oxford et LPM. Plusieurs études (Lee et McClain, 1986; Heisick et al., 1989; Hayes et al., 1992) ont démontré que le milieu sélectif LPM possédait une capacité de récupération plus élevée que d'autres milieux sélectifs utilisés pour isoler *L. monocytogenes* à partir d'échantillons de viande, de lait, de légumes, de fruits frais, de fromages, de volaille, et de fruits de mer. Toutefois, nos résultats sont en accord avec ceux de Warburton et collaborateurs (1991 et 1992). Dans les articles, publiés récemment, ces chercheurs impliqués dans une étude comparative des méthodes de dépistage de *L. monocytogenes* développées par le FDA et par l'USDA, montrent que le milieu Oxford est le milieu le plus efficace pour isoler et pour quantifier *L. monocytogenes* à partir d'échantillons d'aliments et de l'environnement.

Les facteurs de corrélation élevés ( $\geq 0,97$ ), calculés pour toutes les courbes de régression linéaire (voir Fig. 3d' jusqu'à 3i'), indiquent qu'il y a eu une réduction exponentielle de la population suite à l'irradiation. Ces données nous ont permis de

calculer les valeurs de la DRD à partir des droites de régression linéaire respectives. Ces résultats suggèrent que le matériel génétique a été abîmé par le rayonnement ionisant, occasionnant l'irréversibilité de la capacité de réparation du système de réplication cellulaire, empêchant les cellules abîmées de se multiplier et de former, par conséquent, des colonies visibles sur un milieu gélosé (Silverman et Sinskey, 1977). Les courbes de réduction de population obtenues des souches ATCC 19115 (Figures 3e/3e') et 19111 (Figure 3f/3f' et 3g/3g') suivent bien le modèle de courbe appelée exponentielle par Lea et par Gray (cités par Silverman et Sinskey, 1977). L'allure de cette courbe indiquerait un dommage irréversible des cellules par l'irradiation. La Figure 3d/3d' de même que les Figures 3h/3h' et 3i/3i' constituent, d'après nous, des courbes sigmoïdiennes. De telles courbes sont caractérisées par l'apparition d'un épaulement à des doses très faibles qui dans notre cas étaient  $\leq 0,7$  kGy. Elles se transforment par la suite, à des doses plus fortes ( $0,7 \text{ kGy} \leq \text{dose} \leq 1,5 \text{ kGy}$ ) en courbes exponentielles ou monotopiques. L'épaulement qui a aussi été observé avec *Deinococcus radiodurans*, certains coques et certaines souches de *Salmonella typhimurium*, fut attribué à un mécanisme de réparation de l'ADN capable de reconstituer certains bris ou modifications moléculaires provoqués par l'ionisation (Moseley et Laser; Davies et al., cités par Silverman et Sinskey, 1977).

Tel que constaté aux Tableaux 3-I, la souche ATCC 19115 se montre plus radiorésistante que la souche 19111, lorsqu'elles sont récupérées sur la gélose Oxford, alors que la souche 19111 est plus radiorésistante que la souche FDA-1A1, seulement lorsqu'elles sont récupérées sur la gélose LPM. À l'analyse du Tableau 3-II, nous



constatons que la souche ATCC 19115 s'avère plus résistante que la souche ATCC 19111 lorsqu'elles sont récupérées sur les milieux GTS-EL et Oxford. Plusieurs travaux parlent de différences de radiorésistance entre des souches de *L. monocytogenes* distribuées dans un bouillon riche de culture (Farag et al., 1990; Huhtanen et al., 1989; El-Shenawy et al., 1989). Dans ces travaux, la valeur minimale de la DRD variait entre 0,21 et 0,34 kGy et la valeur maximale entre 0,46 et 0,50 kGy, selon la souche et le milieu gélosé utilisé pour la récupération. Ces études ont été réalisées avec les souches en phase stationnaire. Le Tableau 3-II montre que la valeur minimale de la DRD des souches ATCC 19115 et 19111, et FDA-1A1 varie entre 0,144 et 0,251 kGy et la valeur maximale entre 0,348 et 0,503 kGy. La différence de radiorésistance entre les micro-organismes, ou des souches différentes d'un même micro-organisme, peut s'expliquer par leur capacité différente de réparer les dommages subis, principalement, au niveau des acides nucléiques (Davis et Sinskey, citées par Silverman et Sinskey, 1977).

La seule étude recensée, qui compare la radiorésistance de *L. monocytogenes* en phase exponentielle et en phase stationnaire, a été réalisée par Huhtanen et collaborateurs (1989). Ces chercheurs ont obtenu une valeur moyenne de DRD plus élevée pour les souches traitées en phase exponentielle que pour celles traitées en phase stationnaire (0,82 vs 0,61 kGy avec des facteurs de corrélation  $r > 0,990$ ). Nos résultats (Tableaux 3-I et 3-II) montrent également cette différence de radiorésistance selon que les souches sont irradiées en phase exponentielle ou en phase stationnaire de croissance. Toutefois, contrairement aux résultats obtenus par Huhtanen et collaborateurs, les trois souches que

nous avons étudiées se sont avérées généralement moins radiorésistantes quand elles ont été traitées en phase exponentielle. Cette observation rejoint les résultats de plusieurs autres travaux effectués sur d'autres bactéries par Annelis et collaborateurs (1973), par Stapleton et par Spoerl et collaborateurs (cités par Bridges et Horne, 1959). Si d'un côté, il est vrai que les cellules en pleine activité de dédoublement peuvent subir plus fortement les effets néfastes provoqués par le rayonnement ionisant, il n'est pas faux non plus d'admettre que le système de réplication en pleine activité peut plus promptement réparer les bris moléculaires causés par l'ionisation (Thibault, 1989). Ainsi, la capacité de réparation inhérente à chaque souche peut expliquer, en quelque sorte, la contradiction entre nos résultats et ceux obtenus par Huhtanen et collaborateurs (1989), en ce qui concerne la radiorésistance des souches en phase exponentielle.

D'après les résultats présentés au Tableau 3-III, une même souche peut présenter différents degrés de résistance à l'ionisation, selon que l'on fait varier l'intervalle de la dose du traitement. Ceci est très évident pour la souche FDA-1A1 récupérée sur GTS-EL. En utilisant un intervalle de 0,0 à 0,7 kGy par rapport à 0,7 à 1,5 kGy, la radiorésistance de cette souche augmente de manière significative ( $P < 0,05$ ). Huhtanen et collaborateurs (1989) expliquent ce phénomène par le manque d'homogénéité de la culture. En effet, elle comporte des cellules dans des phases de croissance différentes, celles-ci ayant une résistance différente à l'ionisation. Nous remarquons aussi que, lorsqu'on a changé le milieu non sélectif GTS-EL pour les milieux sélectifs Oxford et LPM, les cellules partiellement abîmées par l'irradiation, qui avaient pu être récupérées

sur le premier, ne pouvaient plus l'être sur les derniers. Huhtanen et collaborateurs, ci-précédemment cités, dans leur publication calculent la moyenne des DRD de plusieurs souches et expriment avec cette valeur la DRD de *L. monocytogenes*. C'est dans le but de comparer nos aux siens que nous les avons traités de la même façon. Toutefois, la valeur moyenne de DRD doive être interprétée avec réserve. En effet, nous avons constaté que chacune de nos trois souches a une façon particulière de répondre aux stress qui leurs sont imposés.

Au Tableau 3-IV, on constate que les milieux dans lesquels la souche FDA-1A1 fut irradiée, apportent différents degrés de protection. C'est dans l'eau saline à 0,85% que les cellules ont été le plus exposées aux effets directs et indirects des rayons gamma, suivi de milieux contenant des crevettes homogénéisées ou entières, puis finalement du bouillon BTS-EL. On observe également que le milieu gélosé sélectif Oxford permet l'obtention de valeurs de DRD qui ne sont pas, du point de vue statistique, différentes de celles obtenues avec le milieu gélosé non sélectif GTS-EL.

Charbonneau et collaborateurs (1986) ont déterminé la radiorésistance de la flore bactérienne isolée des crevettes nordiques (*Pandalus borealis* et *Pandalus montagui*) dans une solution physiologique afin de minimiser l'effet protecteur qui pourrait se produire si elle était distribuée dans un milieu protéique. Plusieurs travaux identifient les milieux aqueux comme étant des milieux d'irradiation qui permettent d'obtenir la valeur minimale de DRD (Farag et al., 1990, Patterson, 1989, Huhtanen et al., 1989). Les solutions aqueuses, grâce à leur composition élémentaire, minimisent les interactions solution-

organisme aux dépens de l'action rayonnement-organisme. Elles ne favoriseraient ni la formation de produits radiolytiques complexes, qui pourraient attaquer les bactéries en réduisant leur radiorésistance, ni la présence de substances "bouclier" capables d'absorber une partie des effets du rayonnement ionisant (Thibault, 1989).

Les chercheurs ont également étudié la radiorésistance de *L. monocytogenes* dans différents types d'aliments et dans des bouillons de culture riches. El-Shenawy et collaborateurs (1989) ont obtenu des valeurs de DRD variant de 0,34 à 0,50 kGy pour *L. monocytogenes* irradié dans BTS et des valeurs de DRD variant de 0,51 à 1,00 kGy lorsque l'étude a été effectuée dans de la viande de boeuf hachée. Tout au long de ces expériences, la température était maintenue entre 20 et 21°C. De plus, les valeurs de DRD ont varié selon la souche et le milieu gélosé utilisés. Une radiorésistance accrue de certaines souches de *L. monocytogenes* a également été observée lorsqu'on a distribué les cellules dans de la viande de poulet plutôt que dans un bouillon riche (Huhtanen et al., 1989). Les doses s'échelonnaient entre 0,0 et 2,0 kGy. La DRD moyenne, résultant du traitement de sept souches dans le bouillon nutritif, était de 0,33 kGy, alors qu'elle augmentait à 0,46 kGy pour les mêmes souches distribuées dans le poulet. Farag et collaborateurs (1990) ont également observé une plus grande radiorésistance de *L. monocytogenes* dans le poulet (taux d'humidité de 10,4%) que dans BTS-EL. Ils ont expliqué ce fait par la composition différente des milieux d'irradiation et principalement par le moindre taux d'humidité dans les échantillons de poudre de viande de poulet. Il est bien connu que la sensibilité à l'ionisation est plus élevée en milieux aqueux qu'en

milieux non aqueux en raison de l'action des radicaux libres générés par l'irradiation de l'eau (Thibault, 1989; Farag *et al.*, 1990). Selon Urbain (cité par Patterson, 1989), les différents composants des aliments, comme les protéines, semblent entrer en compétition avec les bactéries en absorbant une partie des radicaux formés durant le procédé d'ionisation. Nous sommes toutefois arrivés à des résultats différents de ceux-là. Les souches FDA-1A1 et 19115, en début de phase stationnaire, distribuées dans la crevette se sont avérées moins radiorésistantes que lorsqu'elles avaient été traitées dans BTS-EL (voir les Tableaux 3-IV et 3-V). Grecz (1965) a rapporté l'effet protecteur de plusieurs substrats face à l'irradiation de *Clostridium botulinum*. Il a constaté que plusieurs aliments offrent des degrés de protection distincts, comme le bacon en conserve qui est moins radioprotecteur que le poulet en conserve ou même que le tampon phosphate. Silverman et Sinskey (1977) nous apprennent que des agents de conservation tels que les nitrates et les nitrites que l'on trouve à des concentrations assez élevées dans les produits charcutiers comme le bacon, réduisent la radiorésistance des organismes. En ce qui concerne la crevette blanchie telle qu'on l'a étudiée, il s'avère que les interactions rayonnement/crevette entière ou homogénéisée ont été plus dommageables pour les souches de *L. monocytogenes* que les interactions rayonnement/BTS-EL.

Les résultats présentés aux Tableau 3-VI montrent que la radiorésistance des souches FDA-1A1 et ATCC 19115 a augmentée de 150% avec la réduction de la température de 0 à -20°C. L'effet protecteur induit par une réduction de température a été également rapporté par Anellis et collaborateurs (1973) utilisant le *Streptococcus*

*faecium*  $\alpha$  21. L'effet protecteur additionnel entraîné par la congélation peut être expliqué par une réduction progressive de la migration des radicaux libres, formés lors de l'ionisation, vers les sites sensibles (molécules d'ADN) des cellules. Les radicaux libres ainsi piégés se recombinent et deviennent non létaux avant que la décongélation se produise. Stegeman (cité par Ryser et Marth, 1991) a déterminé la DRD de la souche Scott A de *L. monocytogenes* dans de la viande de boeuf tranchée et a constaté une augmentation de la radiorésistance d'environ 180% lorsque la température du traitement a été réduite de 22°C. La DRD qui était de 0,38 kGy à 4°C a augmenté à 1,06 kGy avec la réduction de la température à -18°C. Nos résultats montrent également que la gélose Oxford permettait de récupérer, aussi bien que milieu GTS-EL, les souches traitées à 0°C et à -20°C, puisque les valeurs de la DRD ne sont pas différentes du point de vue statistique (voir Tableau 3-VI).

L'étude comparative sur l'efficacité de trois méthodes de dépistage de *L. monocytogenes* a démontré qu'aucune des méthodes n'a dépisté le pathogène ni d'autres *Listeria* spp. de nos échantillons qui n'avaient pas été contaminés ni ionisés (Tableau 3-VIII). De plus, les trois méthodes ont dépisté le germe dans tous les échantillons, soit de ceux qui avaient été contaminés volontairement et non ionisés et ceux qui avaient été contaminés volontairement et ionisés à 2,5 kGy (Tableau 3-VIII).

Le nombre de *L. monocytogenes* volontairement introduit dans les échantillons ( $10^4$  à  $10^5$  ufc/g) représente un niveau de contamination très important selon McCarthy et collaborateurs (1990), qui l'ont néanmoins utilisé pour contaminer la crevette lors d'une

étude comparative de l'efficacité de plusieurs méthodes de dépistage de *L. monocytogenes* stressée par la chaleur. Ces mêmes chercheurs avaient au cours de leur étude dénombré  $10^4$  ufc/g de *L. monocytogenes* et de *L. innocua* dans des échantillons de crevette importée aux États-Unis, provenant du Honduras et de l'Équateur.

Lorsque les échantillons furent soumis à des doses de 3,5 - 4,0 et 5,0 kGy, le nombre d'échantillons à partir desquels *L. monocytogenes* a été isolée a diminué de façon significative. Cinquante-six pour-cent (56%) des échantillons traités à 3,5 kGy hébergeaient *L. monocytogenes* après le traitement. Les deux méthodes, FDA et USDA, ont démontré la même efficacité et leur sensibilité était de 0,45 ufc/g (déterminée par la technique du NPP).

Dans nos expériences, lorsqu'on a augmenté la dose à 4,0 kGy, nous avons observé un changement de l'efficacité des méthodes. Nous avons dépisté *L. monocytogenes* par la méthode d'Enrichissement au froid dans 37,5% des échantillons, par la méthode USDA nous l'avons dépistée dans 31,25% des échantillons et finalement, par la méthode FDA nous l'avons dépistée dans 12,5% des échantillons. Le nombre de *L. monocytogenes* retrouvé dans les échantillons traités à 4,0 kGy, était toutefois inférieur au seuil de sensibilité de la méthode quantitative du NPP utilisée.

Lorsque la dose maximale de 5,0 kGy a été appliquée, seule la méthode d'EF fut capable de dépister *L. monocytogenes*, mais seulement 6,25% des échantillons renfermaient encore le germe. Le nombre de *L. monocytogenes* retrouvé dans l'échantillon était toujours inférieur au seuil de sensibilité de la méthode quantitative du

NPP utilisée.

L'enrichissement au froid est reconnu comme étant capable d'améliorer l'état physiologique de *L. monocytogenes* abîmée à la fois par la chaleur et par la congélation (McCarthy et al., 1990). Ryser et collaborateurs (1985) ont récupéré des cellules partiellement endommagées par la chaleur à partir d'échantillons de fromage cottage, suite à une étape d'enrichissement effectuée à 3°C. Weagant et collaborateurs (1988) ont isolé *Listeria* spp. de 61 % des produits de la mer congelés, importés aux États-Unis, provenant de plusieurs pays. L'enrichissement au froid a également permis à d'autres chercheurs d'isoler la bactérie à partir d'échantillons de choux qui avaient été traités par la chaleur (Beuchat et al., 1986).

McCarthy et collaborateurs (1990) ont développé une version abrégée de la technique d'enrichissement au froid qu'ils ont utilisée, avec succès, pour dépister *L. monocytogenes* à partir d'échantillons de crevette qui avaient été artificiellement contaminés ( $\sim 10^5$  ufc/g), puis bouillis pendant 1, 3 et 5 minutes. La technique proposée par ces derniers prévoit l'entreposage préalable des échantillons au froid durant 3 jours avant le début du travail de dépistage proprement dit. La particularité de leur technique se trouve dans l'étape d'enrichissement au froid qui se fait sans l'ajout de bouillon de culture aux échantillons. Le dépistage se fait par la méthode FDA. Par leur étude, ils ont constaté que l'étape préalable d'enrichissement au froid augmentait de façon significative les chances d'isolement de *L. monocytogenes* fortement stressée par la chaleur.



À notre connaissance, aucune étude portant sur l'effet d'un double stress physiologique causé à la fois par la congélation et par l'ionisation, sur la survie de *L. monocytogenes* n'a été réalisée. En raison de l'existence d'un dommage cellulaire, les cellules partiellement abîmées sont plus fragiles à un stress additionnel (Oscroft *et al.*, 1987). Conséquemment, les cellules subissant la congélation et l'ionisation sont plus vulnérables aux milieux de culture sélectifs, liquides ou solides, lorsqu'elles sont mises en contact avec eux immédiatement après les traitements.

Dans notre étude, les méthodes FDA, USDA et Enrichissement au froid ont démontré une efficacité équivalente dans la récupération de *L. monocytogenes* des échantillons de crevette congelée et ionisée aux plus faibles doses, 2,5 et 3,0 kGy. Pour les doses les plus fortes, 4,0 et 5,0 kGy, les méthodes démontraient une efficacité de récupération distincte. Un nombre plus petit d'échantillons hébergeant la bactérie était détecté lorsque l'analyse était faite avec la méthode FDA. Ce nombre était plus important lorsque les méthodes USDA (4,0 kGy) et Enrichissement au froid (4,0 et 5,0 kGy) étaient utilisées.

La méthode USDA, en raison de son pouvoir tampon supérieur et de l'absence de glucide fermentescible comme le glucose, permet une meilleure récupération de *L. monocytogenes* que la méthode FDA (Bailey *et al.*, 1990). Warburton et collaborateurs (1991), lors d'une étude comparative sur l'efficacité de récupération de *L. monocytogenes* des méthodes FDA et USDA à partir d'échantillons de l'environnement et d'aliments non ionisés, ont constaté que le bouillon de pré-enrichissement utilisé dans la méthode USDA,

gardait davantage la valeur de son pH près de sa valeur initiale que le bouillon de pré-enrichissement utilisé dans la méthode FDA. La récupération de *L. monocytogenes* est défavorisée lorsque le pH baisse au dessous de 5,5 (Bailey et al., 1990).

Les résultats exprimés dans le Tableau 3-VIII vont dans le même sens que ceux de McCarthy et collaborateurs (1990), qui ont démontré que l'étape d'enrichissement de courte durée au froid peut augmenter les chances d'isolation de *L. monocytogenes* stressée.

Lors de la détermination de la radiorésistance de *L. monocytogenes* sur plusieurs milieux gélosés sélectifs, nous avons constaté que le milieu gélosé Oxford permettait mieux que le milieu gélosé LPM de récupérer la bactérie. Cependant, la même constatation n'a pas été possible, lors de l'étude comparative sur l'efficacité des méthodes de dépistage pour récupérer une suspensions de *L. monocytogenes* dans la crevette congelée et ionisée. Dans cette dernière étude, à toutes les fois que *L. monocytogenes* fut dépistée par une ou autre méthode, elle a été aussi bien récupérée sur la gélose Oxford que sur la gélose LPM. On attribue cela au bouillon d'enrichissement qui permettraient une amélioration de l'état physiologique des cellules partiellement endommagées par l'ionisation. De telles cellules supporteraient ultérieurement, davantage, l'effet inhibiteur supérieur du milieu gélosé LPM.

## 5 - CONCLUSION

Le rapport de cause à effet entre la consommation de denrées alimentaires contaminées par *L. monocytogenes* et les intoxications a été établi au début des années 80. Depuis, le secteur alimentaire, les médias et les consommateurs sont, en général, de plus en plus sensibilisés à cette bactérie pathogène largement répandue dans l'environnement. Les experts internationaux qui faisaient partie du groupe de travail de l'OMS sur la listériose alimentaire ont déclaré: "Il est peu réaliste, voire impossible, d'éliminer totalement *L. monocytogenes* de tous les aliments. L'enjeu n'est donc pas trouver la façon d'éliminer l'organisme des aliments, mais bien de le maîtriser afin d'en diminuer le nombre".

Les fruits de mer, lorsqu'ils subissent un très grand nombre de manipulations, constituent un milieu propice au développement de *L. monocytogenes*. Récemment, aux États-Unis, plusieurs rappels d'un grand volume de produits marins (crevette, crabe, homard, etc...) contaminés par *L. monocytogenes*, confirment le sérieux du problème et justifient amplement les nombreuses études portant sur l'usage de la technologie de rayonnement ionisant seule ou conjointement avec la chaleur afin de réduire la présence de cette bactérie pathogène dans cette classe de denrées périssables.

Les résultats relatifs à la détermination de la DRD à l'aide de plusieurs milieux gélosés indiquent, chez les différentes souches de *L. monocytogenes* utilisées, l'existence d'un seuil de résistance distinct. Le degré de sélectivité de la gélose sur laquelle on

recupère directement les cellules stressées par l'ionisation est également important. Nous pensons que, lorsqu'il y a un intérêt à déterminer la radiorésistance de *L. monocytogenes* dans un environnement donné, l'emploi d'une gélose non sélective, telle la GTS-EL, est absolument nécessaire. Le milieu gélosé sélectif Oxford fut, parmi les milieux sélectifs employés, celui qui a permis le mieux de récupérer les cellules à partir des trois souches de *L. monocytogenes* stressées par l'ionisation. Le milieu Palcam a démontré une très faible capacité de récupérer les trois souches traitées dans tous les environnements et conditions étudiés. Ce qui nous permet de déconseiller son emploi, du moins pour le dépistage de *L. monocytogenes* directement dans des denrées traitées par l'ionisation.

La comparaison de la radiorésistance des souches, en phase exponentielle et stationnaire, montrent que les cellules de *L. monocytogenes* en phase stationnaire sont plus résistantes aux effets du rayonnement ionisant ou qu'elles sont capables de réparer beaucoup plus efficacement les dommages causés par l'irradiation que les cellules en pleine activité de réplication.

La variable "température de traitement" représente un paramètre très important lors de l'établissement de la dose de traitement pour un produit donné. Les souches FDA-1A1 et ATCC 19115 deviennent environ deux fois plus radiorésistantes lorsqu'elles sont traitées congelées à -20°C, comparativement à une irradiation à 0°C.

Par rapport à la protection qu'offre le BTS-EL, la crevette ne protège pas davantage *L. monocytogenes* contre les effets du rayonnement gamma. Cependant, tel que prévu, la radiorésistance des souches traitées dans la solution physiologique fut de

beaucoup diminuée. Ceci renforce l'importance de mesurer la DRD dans chaque aliment de manière à définir les conditions d'irradiation.

En ce qui concerne l'étude comparative des méthodes de dépistage de *L. monocytogenes*, on constate qu'une ou l'autre des trois méthodes utilisées peuvent, sans souci, être employées pour son dépistage dans des échantillons de crevette congelée et irradiée. Même si pour une dose de 4,0 kGy la méthode USDA nous a permis d'isoler plus d'échantillons contaminés que la méthode FDA, le nombre d'échantillons employé dans notre étude était trop restreint pour que l'on puisse dire qu'une méthode est meilleure que l'autre. Un séjour au froid des échantillons augmente davantage le délai de réponse qui est déjà de 5 à 10 jours pour les méthodes conventionnelles comme la FDA et la USDA qui emploient l'enrichissement "au chaud". Cette particularité de l'EF, fortement critiqué par plusieurs chercheurs, peut toutefois être bénéfique lorsqu'on constate qu'un séjour au froid peut augmenter de manière sensible les chances d'isolement du germe.

D'après la valeur de DRD obtenue pour la souche ATCC 19115 traitée dans la crevette congelée, on observe que la dose de 5,0 kGy, recommandée en France pour le traitement de la crevette congelée à -18°C, ne serait pas suffisante pour éliminer *L. monocytogenes* des échantillons de crevette éventuellement contaminée ( $ufc > 10^4$ ) avec une souche présentant une radiorésistance égale ou supérieure à celle de la souche ATCC 19115. Toutefois, nous savons que l'observation de bonnes pratiques de fabrication dans l'industrie de transformation des produits marins, associées aux procédés de blanchissement, de refroidissement et/ou de congélation, d'entreposage et de distribution

adéquats, puis de consommation dans les délais et conditions requises, sont des mesures qui garantissent de bas niveaux de contamination des produits marins, tels que la crevette. Ce qui nous permet de dire que l'emploi éventuel de l'irradiation, à la dose recommandée en France pour le traitement de la crevette congelée, pourrait contribuer grandement à l'amélioration de la qualité hygiénique de la crevette.

## 6 - REMERCIEMENTS

Je suis infiniment reconnaissant à Raymond Charbonneau pour la direction de mes travaux de recherche, sa disponibilité et son encouragement. J'ai bien apprécié la contribution de M. Florian Gosselin et de Mme Manon Lorange du Laboratoire de Santé Publique du Québec, qui ont analysé des isolats de *L. monocytogenes*; de Mme France Gaudreault et de Mme Irene Iugovaz de Santé et Bien-être social Canada, du Dr. Marie-Josée Champagne d'Agriculture Canada, du Dr. Jeff Farber de la Division de la recherche, du Bureau des dangers microbiens à Ottawa et du Dr. Susan McCarthy du FDA (succursale Alabama) qui nous ont gracieusement envoyé les souches de *L. ivanovii*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*, et *L. monocytogenes* (souche FDA-1A1), respectivement. J'aimerais également remercier Mme Marie Désy pour le traitement statistique des données; M. Robert Lalonde qui s'est occupé de la dosimétrie et le stagiaire d'été M. Xavier Misone qui a manipulé avec dextérité pendant la dernière étape de la recherche.

À mes parents, à ma soeur Jane, à mon frère Jairo et sa famille, et à des amis qui sont restés et qui m'envoyaient des ondes énergisantes "oméga" non ionisantes, «obrigado»! Des bons souvenirs imprégnés m'ont transporté mille fois chez eux, à 10.000 km d'ici, pendant que j'attendais sonner l'autoclave. Merci aussi à ma compagne Anne pour sa présence, sa générosité et sa complicité.

La réalisation de ce travail fut possible en raison des bourses d'études qui m'ont

été données par l'Institut Armand-Frappier, par mon directeur de recherche Raymond Charbonneau et par l'organisme brésilien CNPq-Conselho Nacional de Pesquisa.



## 7 - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Agriculture Canada, 1992. Colloque sur "L'irradiation au service de l'alimentation", Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe, Québec.

Anellis, A., Berkowitz, D. et Kemper, D., 1973. Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. *Appl. Microbiol.* 25(4): 517-523.

Audurier, A., Chatelain, R., Chalons, F. et Piéchaud, M., 1979. Lysotypie de 823 souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France de 1958 à 1978. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* 130-B: 179-189.

Audurier, A., Rocourt, J. et Courtieu, A. 1977. Isolement et caractérisation de bactériophages de *L. monocytogenes*. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur*, 128-A: 185-198.

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

Beuchat, L.R., Brackett, R.E., Hao, D.Y.-Y. et Conner, D.E., 1986. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice. *Can. J. Microbiol.* 32: 791-795.

Bibb, W.F., Gellin, B.G., Weaver, R. et al., 1990. Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiological investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2133-41.

Bille, J., 1988. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. Proceedings, Society for Industrial Microbiology-Comprehensive conference on *Listeria monocytogenes*, Rohnert Park, CA, Oct.2-5, Abst.I-11.

Bobbitt, J.A. et Betts, R.P., 1992. Confirmation of *Listeria monocytogenes* using a commercially available nucleic acid probe. *Food Microbiol.* 9: 311-317.

Bojsen-Møller, J., 1972. Human listeriosis—diagnostic, epidemiological and clinical studies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Section B, Suppl.* 229: 1-157.

Brackett, R.E., 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technol.* 42: 162-164.

- Bridges, B.A. et Horne, T., 1959. The influence of environmental factors on the microbicidal effect of ionising radiations. *J. Appl. Bacteriol.* 22(1): 96-115.
- Bryan, F.L. 1969. In: Foodborne infections and intoxications, pp. 272-273. H. Riemann (ed.), Academic Press, New York, N.Y.
- Buchanan, R.E. et Gibbons, N.E., 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Cassiday, P.K. et Brackett, R.E., 1989. Methods and media to isolate and enumerate *Listeria monocytogenes*: a review. *J. Food Protect.* 52(3): 207-214.
- Charbonneau, R., Dubois, G., Micusan, V. et Gagnon, M., 1986. Effets des rayons gamma sur la conservation des crevettes nordiques et sur leur flore bactérienne. *Sc. des Aliments* 6: 245-256.
- Colburn, K.G., Kaysner, C.A., Abeyta, C. et Wekel, M.M., 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2007-2011.
- Conner, D.E., Brackett, R.E. et Beuchat, L.R., 1986. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *L. monocytogenes* in cabbage juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 59-63.
- Cotoni, L., 1942. À propos des bactéries dénommées *Listerella*: rappel d'une observation ancienne de méningite chez l'homme. *Ann. Inst. Pasteur* 68: 92-95.
- Curtis, G.D.W., Nichols, W.W. et Falla, T.J., 1989. Selective agents for listeria can inhibit their growth. *Letters in App. Microbiol.* 8: 169-172.
- Darling, C. L., 1975. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. *J. Clin. Microbiol.* 1: 171-174.
- Destro, M.T., Serrano, A. de M. et Kabuki, D.Y., 1991. Isolation of *Listeria* spp. from some Brazilian meat and dairy products. *Food Control* 20: 110-03.
- Dillon, R.M. et Patel, T.R., 1992. *Listeria* in seafoods: a review. *J. Food Protect.* 55(12): 1009-1015.
- Dominguez, L., Garayzabal, J.F.F., Vazquez, J.A., Blanco, J.L. et Suarez, G., 1987. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. *Letters in Appl. Microbiol.* 4: 125-127.

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

El-Shenawy, M.A., Yousef, A.E. et Marth, E.H., 1989. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in broth or in raw ground beef. Lebensm.-Wiss.u.-Technol. 22:387-390.

Espaze, E.P., Miegerville, A.F. et Courtieu, A.L., 1986. Morphologie et position taxonomique de *Listeria denitrificans*. In *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on problems of Listeriosis*, (ed.) Courtieu, A.L., Espaze, E.P. & Reynaud, A.E. Pages 137-146. Université de Nantes, France.

FAO/IAEA/WHO Expert Committee, 1981. Wholesomeness of irradiated food. WHO, technical Report Series 659, Geneva, Switzerland.

Farag, M.D.El-D.H., Shamsuzzaman, K. et Borsa, J., 1990. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in Phosphate Buffer, Tryptcase Soy Broth, and Poultry Feed. J. Food Protect. 53(8): 648-651.

Farber, J.M. 1989. Physical and chemical effects damaging *Listeriae*. Acta Microbiol. Hungarica 36(2-3): 245-247.

Farber, J.M., 1991a. *Listeria monocytogenes* in fish products. J. Food Protect. 54(12): 922-924 et 934.

Farber, J.M., 1991b. *Listeria monocytogenes*. J. Assoc. Anal. Chem. 74(4): 701-704.

Farber, J.M. et Losos, J.Z., 1988. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. Can. Med. Assoc. J. 138: 413-417.

Farber, J.M. et Speirs, J.I., 1987. Monoclonal antibodies directed against the flagellar antigens of *Listeria* species and their potential in EIA-based methods. J. Food Protect. 50(6): 479-484.

Farber, J.M., Sanders, G.W. et Speirs, J.I., 1988a. Methodology for isolation of *Listeria* from foods - a Canadian perspective. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 71: 675-678.

Farber, J.M., Tittiger, F. et Gour, L., 1988. Surveillance of raw-fermented (dry-cured) sausages for the presence of *Listeria* spp. Can. Inst. Food Technol. J. 21: 430-434.

Feresu, S.B., Jones, D. 1988. Taxonomic Studies on *Bronchotrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria*

- Feresu, S.B., Jones, D. 1988. Taxonomic Studies on *Bronchotrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical Lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1165-1183.
- Fleming, D., MacDonald, K., Cochi, S., Hayes, P., Holmes, M. et al., 1984. An outbreak of listeriosis transmitted by pasteurized milk. 24th Intersci. Conf. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC, Abstr. 371:156. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.
- Fraser, J. et Sperber, W., 1988. Rapid detection of *Listeria* in food and environmental samples by esculin hydrolysis. *J. Food Protect.* 51: 762-765.
- Gellin, B.G. et Broome, C.V., 1989. Listeriosis. *Jama* 261: 1313-20.
- George, S.M., Lund, B.M. & Brocklehurst, T.F. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *L. monocytogenes*. *Letters in Appl. Microbiol.* 6: 153-156.
- Giddings, G.G., 1983. Radiation preservation of foods: substerilizing applications. *J. Food Safety* 5: 191-202.
- Grau, F.H. et Vanderlinde, P.B., 1992. Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats 55(1): 4-7.
- Gray, M.L., 1963. Epidemiological aspects of listeriosis. *Am. J. Pub. Health* 53: 554-563.
- Gray, M.L. et Killinger, A.H., 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30: 309-382.
- Gray, M.L., Stafseth, H.J., Thorp, F., Jr., Sholl, L.B. et Riley, W.F., Jr., 1948. A new technique for isolating *Listerellae* from the bovine brain. *J. Bacteriol.* 55: 471-476.
- Grecz, N., 1965. Biophysical Aspects of Clostridia. *J. Appl. Bacteriol.* 28(1): 17-35.
- Harrison, M.A., Huang, Y-W., Chao, C-H. et Shineman, T., 1991. Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. *J. Food Protect.* 54(7): 524-527.
- Harwig, J., Mayers P.R., Brown, B et Farber J.M., 1991. *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Control*, pp. 66-69.

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. et The *Listeria* study group, 1992. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *L. monocytogenes* from naturally contaminated foods. *J. Food Protect.* 55(12): 952-959.

Heisick, J.E., Harrell, F.M., Peterson, E.H., McLaughlin, S., Wagner, D.E., Wesley, I.V. et Bryner, J., 1989. Comparison of four procedures to detect *Listeria* spp. in foods. *J. Food Protect.* 52(3): 154-157.

Hof, H., Seeliger, H.P.R., Schrettenbrunner, A. et Chatzipanagiotou, S. 1986. The role of *L. monocytogenes* and others *Listeria* spp. in foodborne infections. In Proc. 2nd World Congress, Foodborne Infections and Intoxications, Berlin Germany, pp. 220-223.

Huhtanen, C.N., Jenkins, R.K. et Thayer, D.W., 1989. Gamma radiation of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 52(9): 610-613.

Hughey, J.L., Wilger P.A. et Johnson, E.A., 1989. Antibacterial activity of hen egg white lysozyme against *L. monocytogenes* Scott A in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 631-638.

Ivanov, I. et Massalaski, N. 1979. Listeriosis in Bulgaria. In: Problems of listeriosis, Ivanovi, I (ed.), pages 254-263. Sofia: National Agroindustrial Union.

Johnson, J.L., Doyle, M.P. et Cassens, R.G, 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products: a review. *J. Food Protect.* 53(1): 81-91.

Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. et Schoeni, J.L., 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 497-501.

Katoh, H., 1989. Determination of Mean Generation Time for *L. monocytogenes*. Faculty of Education, Chiba University: 1-33, Yayoi-cho, Chiba-shi, Chiba 260.

Kim, C., Graves, L.M., Swaminathan, B., Mayer, L.W., et Weaver, R.E., 1991. Evaluation of hybridization characteristics of a cloned pRF106 probe for *Listeria monocytogenes* detection and development of a nonisotopic colony hybridization assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(1): 289-294.

Klinger, J.D., Johnson, A., Croan, D., Flynn, P., Whippie, M.K., Lawrie, J. et Curiale, M., 1988. Comparative studies of nucleic acid hybridization assay for *Listeria* in foods. *J. Assoc. Anal. Chem.* 71(3): 669-673.

Kvemberg, J.E., 1988. Outbreaks of listeriosis: *Listeria*-contaminated foods. *Microbiol. Sci.* 5: 355-357.

Lee, W.E. et McClain, D., 1986. Improved *L. monocytogenes* selective agar. *Appl. and Environ. Microbiol.* 52(5): 1215-1217.

Leimeister-Wächter, M, et Chakraborty, T., 1989. Gene probes for the detection of *Listeria* spp.. *Acta Microbiol. Hungarica* 36(2-3): 211-213.

Lenonn, D., Lewis, B., Mantell, C., Becroft, D., Dove, B., Farmer, K., Tonkin, S., Yeates, N., Stamp, R. et Mickleson, K., 1984. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediat. Infect. Disease* 3(1): 30-34.

Liston, J., 1990. Microbial hazards of seafood consumption. *Food Technol.* 12: 56-62.

Lovett, J., 1988. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71:658-660.

Lovett, J., 1989. *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Bacteriology Pathogenes. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y.

Lovett, J., Francis, D.W. et Bradshaw, J.G., 1988. Outgrowth of *L. monocytogenes* in foods. Society for Industrial Microbiology-Comprehensive Conference on *L. monocytogenes*, Rohnert Park, CA, Oct. 2-5.

Lovett, J. et Twedt, R.M., 1988. *Listeria*. *Food Technol.*, 188-191.

Matic, S., Mihokovic, V., K-Razem, B. et Razem, D., 1990. The eradication of *Salmonella* in egg powder by gamma irradiation. *J. Food Protect.* 53(2): 111-114.

Mattingly, J.A., Butman, B.T., Plank, M.C. et Durham, R.J., 1988. Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(3): 679-681.

McCarthy, S.A., Motes, M.L. et Mcphearson, R.M., 1990. Recovery of heat-stressed *Listeria monocytogenes* from experimentally and naturally contaminated shrimp. *J. Food Protect.* 53: 22-25.

McClain, D. et Lee, W.H., 1988. Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71(3): 660-664.

McLauchlin, J. 1987. A review: *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* 63, 1-11.

McLauchlin, J., Audurier, A. et Taylor, A.G., 1986. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infection in Britain, 1967-1984: the use of serotyping and phage typing. *J. Med. Microbiol.* 22: 367-77.

Mead, G.C., Hudson, W.R. et Ariffin, R., 1990. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on irradiated poultry carcasses. *The Lancet*, April 28: 1036.

Motes, M.L. Jr., 1991. Incidence of *Listeria* spp. in shrimp, oysters, and estuarine waters. *J. Food Protect.* 54(3): 170-173.

Murray, E.G.D., Webb, R.A. et Swann, M.B.R., 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed Bacillus: *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407.

Nerkar, D.P. et Bandekar, J.R., 1990. Elimination of *Salmonella* from froze shrimp by gamma radiation. *J. Food Safety* 10: 175-180.

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

Nieman, R.E. et Lorber, B., 1980. Listeriosis in adults: A changing pattern. *Rev. Infect. Dis.* 2: 207-227.

Nyfeldt, A., 1929. Étiologie de la mononucléose infectieuse. *Compt. Rend. Biol.* 101: 590.

Organisation Mondiale de la Santé, 1988. Rapport: listériose d'origine alimentaire. Genève, 15-19 février.

Oscroft, C.A., Alcock, S.J. et Clayden, J.A., 1987. Recovery of sub-lethally injured bacteria from frozen foods. *Food Microbiol.* 4: 257-268.

Parish, M. E. et Higgins, D.P., 1989. Survival of *L. monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food Protect.* 52: 144-147.



- Patterson, M., 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate-buffered saline. *Letters Appl. Microbiol.* **8**: 181-184.
- Perng, F.-S. et Yang, J.-S., 1990. Ultrastructural effect of gamma radiation on grass shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius). *Radiat. Phys. Chem.* **35**(1-3) 258-262.
- Peterkin, P.I., Idziak, E.S. et Sharpe, A.N., 1992. Use of a hydrophobic grid-membrane filter DNA probe method to detect *Listeria monocytogenes* in artificially-contaminated foods. *Food Microbiol.* **9**: 155-160.
- Petran, R.L. et Zottola, E.A. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.* **54**(2): 458-460.
- Pirie, J.H.H., 1927. A new disease of veld rodents, "Tiger river disease". *Publ. S. Africa Inst. Med. Res.* **3**: 163.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. et Vandebergh, P.A., 1988. Inhibition of *L. monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pesicoccus acidilactici* PAC 1.0. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2349-2353.
- Renaud, F. et Freney, J., 1988. *Listeria*. *Bactériologie Médicale Pratique* **39**(3): 175-181.
- Rocourt, J., 1989. Species of the genus *Listeria*. *Acta Microbiol. Hungarica* **36**(2-3): 285-288.
- Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P.A.D., Seeliger, H.P.R., 1982. DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato. *Current Microbiol.* **7**: 383-388.
- Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R et Bille, J., 1986. Virulence modérée d'une souche humaine de *Listeria seeligeri*. In *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on Problems of Listeriosis* (ed.) Courtieu, A.L., Espaze, E.P. et Reynaud, A.E., pages 266-270. Nantes: Université de Nantes.
- Rocourt, J., Wehmeyer, U., Cossart, P. et Stackebrandt, E., 1987a. Proposal to retain *L. grayi* et *L. murrayi* in the genus *Listeria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 298-300.
- Rocourt, J., Wehmeyer, U. et Stackebrandt, E., 1987b. Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Joanesia* gen. nov. as *Joanesia denitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 266-270.



Rorvik, L.M. et Yndestad, M., 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Int. J. Food Microbiol.* 13: 97-104.

Ryser, E.T. et Marth, E.H., 1991. *Listeria, listeriosis and food safety*. Marcel Dekker, Inc. (ed.). New York.

Ryser, E.T., Marth, E.H. et Doyle, M.P., 1985. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *J. Food Protect.* 48(9): 746-750.

Santé et Bien-être social Canada, 1988. Rapport hebdomadaire des maladies au Canada 14-34: 151-155.

Santé et Bien-être social Canada, 1989. Rapport hebdomadaire des maladies au Canada 15-43: 213-216.

Santé et Bien-être social Canada, 1991. Rapport hebdomadaire des maladies au Canada 17-8: 41-48.

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. et Broome, C.V. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308(4): 203-206

Seeliger, H.P.R. 1961. *Listerioses*, Hafner publishing Co., New York

Seeliger, H.P.R. et Finger, H., 1983. Listeriosis. In: *Infectious diseases of the foetus and newborn infant*. J.S. Remington and J.O. Klein (eds.), 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia.

Seeliger, H.P.R. et Hohne, K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes*. In: *Methods in Microbiology*. Bergan, T. & Norris, J.R. (eds.) 13: 31-49. New York.

Seeliger, H.P.R. et Jones, D., 1986. In P.H.A. Sneath, N.S. Marr, M.E. Sharpe et J.G. Holt (eds). *Bergey's Man. Syst. Bacteriol.* 2: 1235-1245. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.

Skovgaard, N., 1989. *Listeria* in foods and environnement-*Listeria*:ecology in the food chain (A review). *Acta Microbiol. Hungarica* 36(2-3): 239-43.

Shahaman, M., Seaman, A. et Woodbine, M., 1980. Influence of sodium chloride, pH and temperature on the inhibitory activity of sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. In *Technical Series No. 14, Soc. Appl. Bacteriol.*, Academic Press, London, pp. 227-237.

- Silverman, G.J. et Sinskey, A.J., 1977. Sterilization by ionizing irradiation. In S.S. Block (ed.), *Desinfection, Sterilization and Preservation* - Lea and Febiger, Philadelphia, PA.
- Sohier, R., Benazet, F., Péchaud, M. 1948. Sur un germe du genre *Listeria* apparemment non pathogène. *Ann. Inst. Pasteur*, 74: 54-57, Paris.
- Soot, D.W., 1954. Report of a case of listeriosis in a human. *Can. J. Med. Technol.* 16: 142-146
- Sorrels, K.M., Enigl, D.C. et Hatfield, J.R., 1989. Effects of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *L. monocytogenes*. *J. Food Protect.* 52: 571-573.
- Stahl, V., 1989. *Listeria monocytogenes*-rapport bibliographique. A.E.R.I.A.L., Strasbourg, France.
- Stuart, S.E. et Welshimer, H.J. 1973. Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 23, 8-14.
- Stuart, S.E. et Welshimer, H.J. 1974. Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a new genus *Murraya*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24: 177-185.
- Thibault, C., 1989. Étude des effets des rayons gamma sur la flore bactérienne et la conservation des filets de morue (*Gadus morhua*). Mémoire de maîtrise en microbiologie appliquée présenté à l'Institut Armand-Frappier/Université du Québec.
- Walker, S.J. et Stringer, M.F. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol. (Abstracts of papers)*, 63(6): XX.
- Warburton, D.W. et Farber, J.M., 1990. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les aliments excepté la viande, DGPS-Santé et Bien-être social Canada.
- Warburton, D.W., Farber, J. M., Armstrong, A., Caldeira, R., Tiwari, N.P., Babiuk, T., Lacasse, P. et Read, S., 1991. A Canadian comparative study of modified versions of the "FDA" et "USDA" methods for the detection of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 54(9): 669-676.
- Warburton, D.W., Farber, J.M. et Balbiuk, T., 1992. Isolement de *Listeria monocytogenes* dans tous les types d'aliments et dans les échantillons prélevés dans l'environnement (MFHPB-30). DGPS, Santé et Bien-être social Canada.

Weagant, S.D., Sado, P.N., Colburn, K.G., Torkelson, G.D., Stanley, F.A., Krane, M.H., Shields, S.C. et Thayer, C.F., 1988. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Protect.* 51(8): 655-657.

Welshimer, H.J., 1960. Survival of *L. monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.* 80: 316-320.

Welshimer, H.J., 1981. In: The Prokaryotes. Starr, P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. et Schlegel, H.G. (eds.), 2(132): 1680-1687.

## 8 - ANNEXES

**Annexe I:** Quelques milieux de cultures liquides pouvant être utilisés pour l'enrichissement au froid de *Listeria monocytogenes* à 4°C:

Bouillon tryptose (BT)<sup>a</sup>

BT + chlorhydrate de tryflavine (10 mg), acide nalidixique (40 mg), cycloheximide (50 mg)\*

Bouillon nutritif Oxoid, no. 2, (ONB2)<sup>a</sup>

Bouillon phosphate tryptose (BPT)<sup>a</sup>

Bouillon trypticase soja (30 g) + extrait de levure (6 g) [BTS-EL]<sup>a</sup>

Bouillon d'infusion coeur-cervelle (BICC)<sup>a</sup>

Bouillon d'enrichissement FDA: BTS-EL + chlorhydrate d'acriflavine (15 mg), acide nalidixique (40 mg), cycloheximide (50 mg)\*<sup>a</sup>

\* Milieux pouvant également servir à l'enrichissement sélectif au chaud.

<sup>a</sup> Milieux commercialisés par Oxoid et/ou BBL et/ou DIFCO.

Les quantités non indiquées, peuvent être quelque peu différentes de celles prescrites par les fournisseurs, voir les références indiquées par Ryser et Marth, 1991. Les quantités spécifiées sont ajoutées à 1000 mL d'eau distillée.

Source: Ryser et Marth, 1991.

**Annexe II:** Quelques milieux de cultures liquides pouvant être utilisés pour l'enrichissement sélectif au chaud (30 à 37°C) de *L. monocytogenes*:

Bouillon d'enrichissement FDA: BTS-EL + chlorhydrate d'acriflavine (15 mg), acide nalidixique (40 mg), cycloheximide (50 mg)\*a

Bouillon Fraser: Proteose peptone, Tryptone, poudre Lab-Lemco, Extrait de levure (5 g chaque), NaCl (20 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (12 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (12 g), esculine (1 g), acide nalidixique (20 mg), LiCl (3 g), chlorhydrate d'acriflavine (25 mg), citrate d'ammonium ferrique (0,5 g)\*

Milieu Université de Vermont (UVM): Proteose peptone, Tryptone, Lab-Lemco powder, Yeast extract (5 g chaque), NaCl (20 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  (12 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,35 g), esculine (1 g), acide nalidixique (40 mg), chlorhydrate d'acriflavine (12 mg)\*a

USDA LEB I (UVM I): UVM + acide nalidixique (20 mg), chlorhydrate d'acriflavine (12 mg)\*a

USDA LEB II (UVM II): UVM I + acide nalidixique (10 mg), chlorhydrate d'acriflavine (12,5 mg)\*a

Bouillon de pré-enrichissement IDF: Peptone (10 g), NaCl (5 g),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (9 g),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (1,5 g)

Bouillon d'enrichissement IDF: BTS-EL + chlorhydrate d'acriflavine (10 mg), acide nalidixique (40 mg), cycloheximide (50 mg)

\* Milieux commercialisés par Oxoid et/ou BBL et/ou DIFCO

a Milieux rapportés avoir déjà été utilisés pour isoler *L. monocytogenes* des produits de mer.

Les quantités non indiquées, peuvent être quelque peu différentes de celles prescrites par les fournisseurs, voir les références indiquées par Ryser et Marth, 1991. Les quantités spécifiées sont ajoutées à 1000 mL d'eau distillée.

Source: Ryser et Marth, 1991.

**Annexe III:** Quelques milieux gélosés sélectifs pouvant être utilisés pour l'isolement de *Listeria monocytogenes*:

Gélose McBride *Listeria* (MLA): gélose Phényléthanol (35.5 g) + glycine (10 g), LiCl (0,5 g), sang de mouton (5%)\*a

Gélose McBride *Listeria* modifiée FDA (FDA-MMLA): Gélose Phényléthanol (35,5 g), glycine (anhydride) (10 g), LiCl (0,5 g), cycloheximide (0,2 g)\*a

Gélose LPM: MLA - (glycine (10 g) + sang de mouton (5%)) + anhydride de glycine (10 g), LiCl (4,5 g), moxalactam (20 mg)\*a

Gélose Vogel-Johnson modifiée (MVJ agar): Base pour gélose Vogel-Johnson (60 g) + acide nalidixique (50 mg), bacitracin (20 mg), moxalactam (5 mg), solution de tellurite de potassium à 1% (20 mL)\*a

Gélose d'Oxford (OXA): Base de gélose Columbia (39 g), esculine (1 g), citrate ferrique ammoniacal (0,5 g), LiCl (15 g), cycloheximide (400 mg), colistine (sulfate) (20 mg), acriflavine (5 mg), céfotétan (2 mg), fosfomycine (10 mg)\*a

Gélose d'Oxford modifiée (MOXA): Base de gélose Columbia (39 g), esculine (1 g), citrate ferrique ammoniacal (0,5 g), LiCl (15 g), solution de colistine à 1% (1 mL), solution de moxalactame à 1% (1 mL), agar (2 g)

Gélose *Listeria* Merck: Milieu de base + acriflavine (10 mg), acide nalidixique (40 mg)\*

Milieu de base gomme-nalidixique (GBNA): Bouillon Tryptone (Oxoid) (10 g), acide nalidixique (50 mg), MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O (0,7 g), «Hydrocolloid gum» (Merck-Gellan Gum KA40) (8 g)\*a

«Trypaflavine nalidixique acid serum agar» (TNSA): Peptone (10 g), poudre Lab-Lemco power (10 g), NaCl (5 g), sérum bovin inactivé (50 mL), trypaflavine (20 mg), acide nalidixique (40 mg), polymixine-B-sulphate (3 mg), gélose (15 g)

**ANNEXE III (suite):**

Palcam: Base de gélose Columbia sang (39 g) + extrait de levure (3 g), glucose (0,5 g), esculine (0,8 g), citrate ferrique ammoniacal (0,5 g), mannitol (10 g), rouge de phenol (0,08 g), LiCl (15 g), polymixine-B-sulfate (10 mg), acriflavine (5 mg), ceftazidime (20 mg)\*a

\* Milieux gélosés commercialisés par Oxoid et/ou BBL et/ou DIFCO et/ou Merck.

a Milieux gélosés rapportés avoir déjà été utilisés pour l'isolation de *L. monocytogenes* des produits de mer.

Les quantités spécifiées sont ajoutées à 1000 mL d'eau distillée.

Source: Ryser et Marth, 1991.