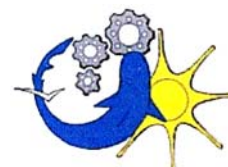




Agence française
de sécurité sanitaire
des aliments



IUP QPAH
Institut Universitaire
et Professionnelle
Qualité des Procédés
Agroalimentaires
et Halieutiques

Rapport de stage technicien

Potentiel de croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon salé

Par
Nicolas Radomski
2004-2005

Sous la direction du maître de stage
Madame Bourdin

AFSSA
Rue Hubert-Lagache
62327 Boulogne sur mer
Tél. : 03 21 99 25 00
Fax : 03 21 30 95 47
Site : <http://www.afssa.fr>

ULCO, Quai Robert Masset
Boulevard Napoléon
62327 Boulogne sur mer
Tél. : 03 21 99 45 00
Fax : 03 21 99 45 10
Site : <http://iup-qpah.univ-littoral.fr>
Mél : IUP.QPAH@univ-littoral.fr



Remerciements

Je remercie Monsieur Malle, directeur de l'AFSSA de Boulogne sur mer de m'avoir accueilli au sein de cet établissement public d'expertise et de recherche.

Je tiens tout particulièrement à remercier Mme Bourdin, mon maître de stage, pour les conseils qu'elle m'a donnés, au cours de la rédaction de ce rapport et durant l'utilisation de logiciels informatiques et la mise en œuvre de différentes techniques analytiques.

Merci à Mr Cizeron, Mlle Copin, Mlle Debuiche, Mme Degremont, Mlle Ducrocq, Mr Duflos, Mlle Leleu, Mme Holuigue, Mme Huchin, Mme Lavieville et Mme Quenu pour avoir consacré une partie de leur temps pour répondre à mes questions et m'aider au cours des manipulations.

Merci à tous les membres de l'AFSSA de Boulogne sur mer pour leur accueil chaleureux et l'agréable ambiance de travail qu'ils ont su créer au laboratoire.



Lexique

Lexique 1 : AFSSA : Agence française de sécurité sanitaire des aliments

Lexique 2 : OGM : Organisme génétiquement modifié

Lexique 3 : ESB : Encéphalopathie spongiforme bovine

Lexique 4 : Aw : Activity Water

Lexique 5 : VP RM : Voges Proskauer Rouge Méthyle

Lexique 6 : CAMP Christie, Atkins, Munch, Petersen

Lexique 7 : SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

Lexique 8 : MPA : Monocytosis Producing Activity

Lexique 9 : ISA : Immuno Suppressive Activity

Lexique 10 : DLC : Date Limite de Consommation

Lexique 11 : D : Dose de réduction décimal (pour réduire de 90% une population)

Lexique 12 : CEVPM : Centre d'Etude et de Valorisation des Produits de la Mer

Lexique 13 : DO : Densité optique (sans dimension)

Lexique 14 : COFRAC : Comité Français d'accréditation

Lexique 15 : ADN / ARN : Acide Désoxyribonucléique / Ribonucléique

Lexique 16 : N : Population bactérienne (UFC.g⁻¹)

Lexique 17 : V : Vitesse de croissance (UFC.g⁻¹.h⁻¹)

Lexique 18 : μ : Taux de croissance (UFC.g⁻¹.h⁻¹)

Lexique 19 : tg : Temps de génération (h)

Unités

Unité 1 : kDa : kilo Dalton

Unité 2 : UFC : Unité Formant Colonie

Unité 3 : kGy : kilo Gray



Sommaire du rapport

Remerciements	1
Lexique.....	2
Unités	2
Sommaire du rapport.....	3
Sommaire des Graphiques.....	5
Sommaire des Figures	5
Sommaire des Photographies	5
Introduction :	6
I / Présentation de l'AFSSA :	6
I.1 / Historique :	6
I.2 / Rôle :	6
I.2.a / Domaine de la sécurité alimentaire :	6
I.2.b / Domaine du médicament vétérinaire :	7
I.3 / Organisation de l'AFSSA :	7
I.3.a / Domaine de la sécurité alimentaire :	7
I.3.b / Domaine du médicament vétérinaire :	7
I.4 / Localisation :	7
I.5 / Lieu du stage effectué : AFSSA de Boulogne sur mer :	8
I.5.a / Typologie des recherches de l'AFSSA de Boulogne sur mer :	8
I.5.b / Organisation de l'AFSSA de Boulogne sur mer :	8
I.5.c / Localisation de l'AFSSA de Boulogne sur mer :	8
II / Etude bibliographique :	9
II.1 / Présentation de <i>Listeria monocytogenes</i> :	9
II.1.a / Historique :	9
II.1.b / Classification :	9
II.1.c / Caractéristiques morphologiques et biochimiques :	9
II.1.d / Caractéristiques physiologiques : (Farber, 1993; Larpent, 2000).....	11
II.1.e / Pouvoir pathogène chez l'homme : (Berche, 1999; Larpent, 2000).....	11
II.1.f / Facteurs de virulence :	13
II.1.g / Moyen de lutte :	14
II.2 / Risque <i>L.monocytogenes</i> dans l' agroalimentaire :	14
II.2.a / Dans l'agroalimentaire en général :	14
II.2.b / Dans l'halieutique :	15
II.3 / Etudes de l'AFSSA sur <i>L.monocytogenes</i> :	16



III / Matériels et Méthodes :	17
III.1 / Préparation de l'étude :	17
III.1.a / Traitement du saumon salé :	17
III.1.b / Les souches utilisées :	17
III.1.c / Préparation de l'inoculum :	18
III.1.d / Méthode d'inoculation des matrices :	19
III.1.e / Conservation des matrices inoculées :	19
III.2 / Analyses réalisées :	20
III.2.a / Analyses Physico-chimiques réalisées :	20
III.2.b / Dénombrement de <i>L.monocytogenes</i> sur les échantillons inoculés :	20
III.2.c / Détection et dénombrement de <i>L.monocytogenes</i> sur les échantillons non inoculés :	21
III.2.d / Dénombrement de la flore totale :	22
III.3 / Traitement des résultats :	23
III.3.a / Etablissement des courbes de croissance :	23
III.3.b / Calcul des indicateurs de croissance :	23
IV / Résultats:	25
IV.1 / Croissance de <i>L.monocytogenes</i> dans du saumon salé :	25
IV.1.a / Détermination de la nature Physico-chimique du saumon salé :	25
IV.1.b / Contrôle du bon déroulement du test de croissance :	26
IV.1.c / Comparaison des deux souches :	26
IV.1.d / Comparaison des inoculum :	27
IV.1.e / Comparaison des matrices :	28
IV.1.f / Comparaison du développement des flores totales :	29
IV.2 / Croissance de <i>L.monocytogenes</i> dans du saumon cru, fumé et salé à l'aneth :	29
IV.2.a / Etude du saumon cru :	30
IV.2.b / Etude du saumon fumé :	30
IV.2.c / Etude du saumon salé à l'aneth :	30
V / Discussion :	31
VI / Perspectives et conclusion générale :	36
Références bibliographiques	39
Sommaire des annexes	41
Annexes	42
Sommaire des compositions de milieu	55
Composition de milieu	56



Sommaire des Graphiques

Graphique 1 : Histogramme de la proportion relative des bactéries responsables des méningites de 1991 à 2001	15
Graphique 2 : Calcul de la vitesse de croissance V.....	24
Graphique 3 : Calcul du taux de croissance μ	24
Graphique 4 : Calcul du temps de génération t_g	25
Graphique 5 : Cinétiques de croissances de <i>L.monocytogenes</i> (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différentes températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g ⁻¹ sur le saumon salé.	27

Sommaire des Figures

Figure 1 : Carte de la zone portuaire de Boulogne sur mer.....	8
Figure 2 : Phénomène de transillumination optique chez <i>L.monocytogenes</i>	10
Figure 3 : Mise en phase stationnaire de souche de <i>L.monocytogenes</i>	18
Figure 4 : Préparation de la suspension de <i>L.monocytogenes</i>	18
Figure 5 : Technique non conventionnelle de dénombrement de <i>L.monocytogenes</i>	21
Figure 6 : Méthode de détection et dénombrement de <i>L.monocytogenes</i> , issue de la norme NFV08-051	22
Figure 7 : Méthode de dénombrement des microorganismes aéroanaérobie facultatifs à 30°C, issue de la norme NFV08-051	23
Figure 8 : Tableau récapitulatif des calculs de temps de génération t_g (h) pour l'étude du saumon salé	28

Sommaire des Photographies

Photographie 1 : a / Microscopie à balayage électronique de Bacilles	10
Photographie 2 : b / Coloration de Gram sur <i>Listeria</i> vue au microscope	10
Photographie 3 : a / Abdomen d'un nouveau-né atteint de <i>granulomatis infantiseptica</i>	12
Photographie 4 : b / Placenta d'avortement après une infection à <i>L.monocytogenes</i>	12
Photographie 5 : Coloration de Gram sur un liquide céphalo-rachidien de méningite à <i>L.monocytogenes</i>	13



Introduction :

Etudiant à l'Institut Universitaire et Professionnelle Qualité des Produits Alimentaires et Halieutiques, j'ai effectué pour l'année de la licence un stage technicien de dix semaines, prévu dans l'enseignement de cette seconde année d'étude. Ce stage s'est déroulé du 07/02 au 16/04/05 à l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments de Boulogne sur mer, qui est spécialisée dans le domaine de l'halieutique.

La sécurité alimentaire contemporaine fait face à de nombreux problèmes d'ordre microbiologique. L'étude suivante rentre dans ce cadre en se penchant sur le risque *Listeria monocytogenes* et tout particulièrement dans le domaine halieutique où cette bactérie peut représenter un risque de santé public. Ce risque est évalué sur du saumon salé conditionné sous vide, par la mise en place de tests de croissance dans les conditions vraisemblables de production et commercialisation.

I / Présentation de l'AFSSA :

I.1 / Historique :

L'AFSSA (Lexique 1) est un établissement public placé sous la tutelle des ministères de la Santé, de l'Agriculture et de la Consommation. Sa création date de la loi du 1^{er} juillet 1998, mise en application en avril 1999 et visant à renforcer la veille et la sécurité sanitaire en France.

I.2 / Rôle :

Cette agence peut s'auto saisir ou être saisie par ces trois ministères de tutelle, par des associations de consommateurs depuis le décret du 13 décembre 2000. L'AFSSA a la possibilité d'alerter les pouvoirs publics ou même suivre des travaux scientifiques dont les sujets justifient des études. Pour ce faire, elle a des fonctions d'évaluation, de recherche et d'appui scientifique et technique dans les domaines de la sécurité alimentaire et du médicament vétérinaire.

I.2.a / Domaine de la sécurité alimentaire :

Son rôle principal est de participer au maintien et au développement de la sécurité sanitaire de l'alimentation de la production des matières premières, jusqu'à l'arrivée des produits transformés aux consommateurs. L'AFSSA est systématiquement consultée sur les projets de lois, décrets, arrêtés et transpositions de réglementation européenne et peut être consultée en urgence sur l'autorisation de consommation de produits alimentaires. Par exemple, des rapports rendus publics, ont porté sur des sujets tels que : la consommation de produits de la mer, la pollution accidentelle des naufrages de l'Erika et du Prestige en 1999 et 2002, la contamination toxique à la dioxine, le risque des OGM (Lexique 2), l'émergence et la ré-émergence de pathologie, le risque ESB (Lexique 3), les aliments à



risque vis à vis de *Listeria monocytogenes* ou encore la supplémentation en vitamines et minéraux des aliments.

I.2.b / Domaine du médicament vétérinaire :

L'AFSSA est aussi amenée à réaliser des travaux dans le domaine du médicament vétérinaire. Cette agence a trois rôles dans ces domaines :

- Délivrer et suspendre les autorisations de mise sur le marché.
- Contrôler les produits et la publicité des entreprises pharmaceutiques.
- Faire le lien entre la pharmacovigilance vétérinaire et les centres de pharmacovigilance des écoles nationales vétérinaires.

I.3 / Organisation de l'AFSSA :

L'organisation de l'AFSSA (Annexe 1) se calque sur ces deux rôles principaux.

I.3.a / Domaine de la sécurité alimentaire :

Les douze laboratoires de l'AFSSA ont chacun leur spécialité et ont des activités de recherche dans 4 domaines :

- La santé animale et le bien être des animaux.
- L'hygiène et la qualité des aliments.
- La nutrition.
- L'hydrologie.

Parallèlement 250 experts, nommés suite à une procédure d'appel public, forment dix comités. (Annexe 2) L'AFSSA s'appuie sur ces comités d'experts, qui sont coordonnés par la direction de l'évaluation des risques nutritionnels et sanitaires.

I.3.b / Domaine du médicament vétérinaire :

En ce qui concerne l'évaluation et le contrôle des médicaments vétérinaires, l'AFSSA comprend en fait, l'agence nationale du médicament vétérinaire, qui organise son activité indépendamment du domaine de la sécurité alimentaire.

I.4 / Localisation :

Les douze laboratoires de l'AFSSA se situent dans dix sites, recouvrant ainsi la quasi-totalité de la France. (Nord-Pas-de-Calais, Basse Normandie, Bretagne, Poitou-Charentes, Ile-de-France, Lorraine, Rhône-Alpes, Provence-Alpes-Côte-d'Azur) Quant à l'Agence Nationale du médicament vétérinaire, celle-ci est basée en Bretagne. (Annexe 3)



II / Etude bibliographique :

II.1 / Présentation de *Listeria monocytogenes* :

II.1.a / Historique :

En 1926, Murray, Webb et Swann ont isolé cette bactérie ubiquiste pour la première fois à partir de lapins atteints de mononucléose et ce n'est que depuis les années 80 que *Listeria monocytogenes* est recherchée. Avant, cette dernière fut baptisée *Bacillus hépatitis* par Hülphers en 1911, X *Bacillus* par des auteurs russes en 1924, *Listeria hépatolytica* par Pirie en 1927, *Listeria ovis* par Gill ou *Bacterium monocytogenes hominis* par Nyfeldt en 1929 puis *Listeria monocytogenes* en 1940 après que Burn ait démontré son rôle dans l'infection péritonéale en 1933. (Croizé, 2000; Allerberger, 2003; Hof, 2003)

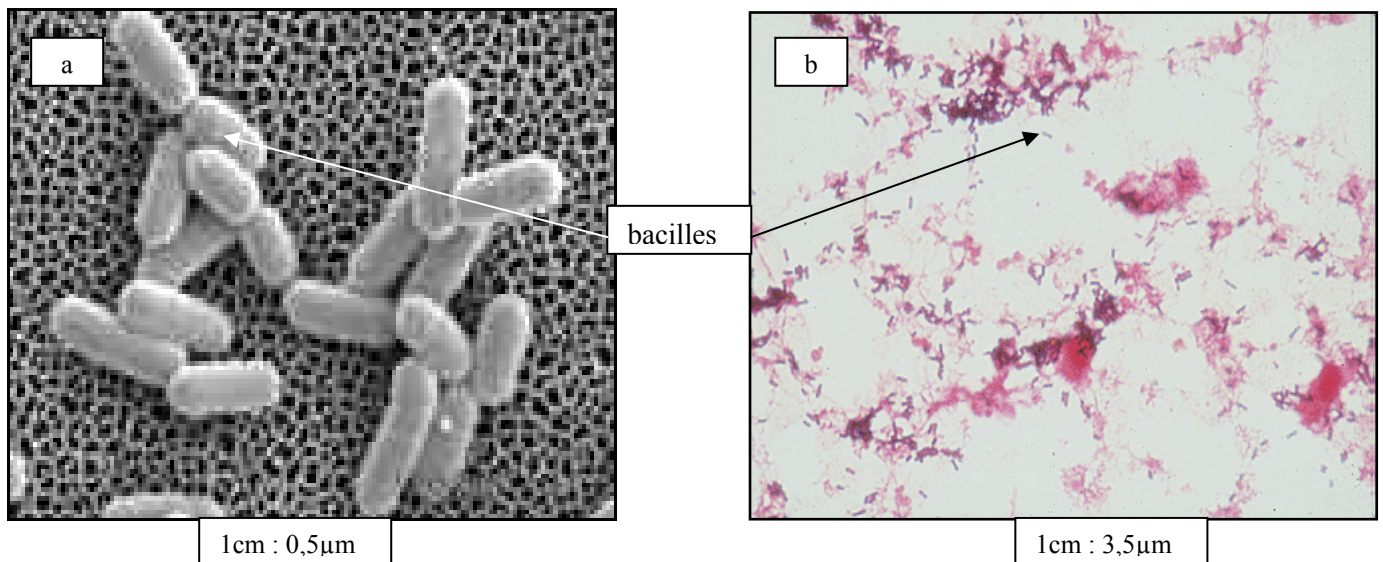
II.1.b / Classification :

La famille des *Listeriaceae* contient les genres *Listéria* et *Brochothrix*. Plus généralement, les *Listéria* sont regroupées dans la section des bâtonnets Gram+ réguliers et non sporulés. (Annexe 4) Le genre *Listéria* comporte les espèces *innocua*, *seeligeri*, *welshimeri*, *ivanovii*, *grayi*, *murrayi* et *monocytogenes*. Seule cette dernière est pathogène pour l'homme et les animaux. *L. ivanovii* est pathogène uniquement pour les animaux. (Williams and Wikins, 1994)

II.1.c / Caractéristiques morphologiques et biochimiques :

Listeria monocytogenes est une bactérie à Gram + sous forme de bâtonnet réguliers de 0,5-2,0 µm de longueur sur 0,4-0,5 µm de diamètre. (Photographie 1 et Photographie 2)





Photographie 1 : a / Microscopie à balayage électronique de Bacilles

http://www.lille.inra.fr/unites/unite_va.htm

Photographie 2 : b / Coloration de Gram sur *Listeria* vue au microscope

<http://coproweb.free.fr/pagbac/introbac/listeria.htm>

A extrémités arrondies associées parallèlement en courte chaîne ou en paires formant un « V », (Photographie 5) ce bacille n'est ni sporulé, ni capsulé, mais peut être mobile à 20-25°C par flagelles péritriche. Ce pathogène pour l'homme chimio-organotrophe peut être indépendant vis à vis de l'oxygène car son type respiratoire est aéroanaérobie facultatif. Cette bactérie se caractérise par une catalase +, une oxydase –, une nitrate réductase – et une importante production de L(+)-lactate à partir de glucose. (Annexe 5) De plus la production de cytochrome permet une identification des colonies. En effet le phénomène de transillumination permet d'observer un reflet bleuté des colonies sous un angle d'incidence de 45°. (Figure 2) (Williams and Wikins, 1994)

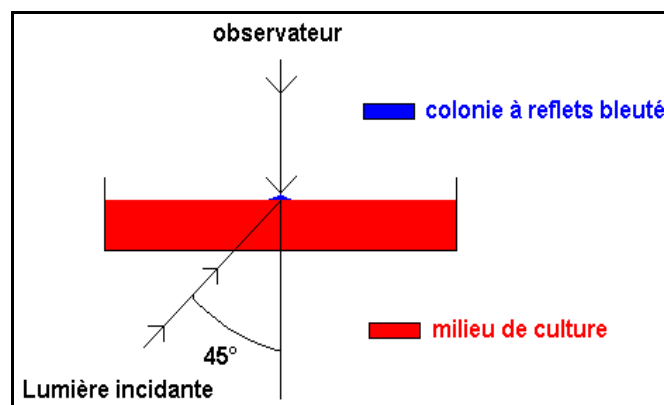


Figure 2 : Phénomène de transillumination optique chez *L.monocytogenes*



II.1.d / Caractéristiques physiologiques : (Farber, 1993; Larpent, 2000)

• Température : En laboratoire, sur tryptone 1 %, extrait de levure 1 %, K_2HPO_4 0,3 % et glucose 0,1 %, *L.monocytogenes* a un maximum, un optimum et un minimum de croissance de 40-45, 38 et 3°C. Cependant, il a été montré que sur tryptose soja agar, cette bactérie psychrotrophe peut se développer à 1,1°C (+0,3). D'autres études ont démontré que des souches de *L.monocytogenes* ont un temps de génération de 62 à 131h sur bouillon de volaille et lait pasteurisé, respectivement à -0,1 et -0,4°C.

• pH : Cette bactérie neutrophile peut se multiplier à un pH de 4,39 à 9,4 avec un optimum de croissance à 7,0. Par ailleurs elle tolérante d'avantage un pH alcalin qu'acide.

• NaCl : Sur Nutriment broth à 10 % de NaCl, un développement est constatable et une survie est possible jusqu'à 150j sur du NaCl pur. De plus à une concentration de NaCl fixe, le temps de survie de cette bactérie halophile, est inversement proportionnel à la température d'incubation. Ce qui est un risque non négligeable pour des produits salés et réfrigérés.

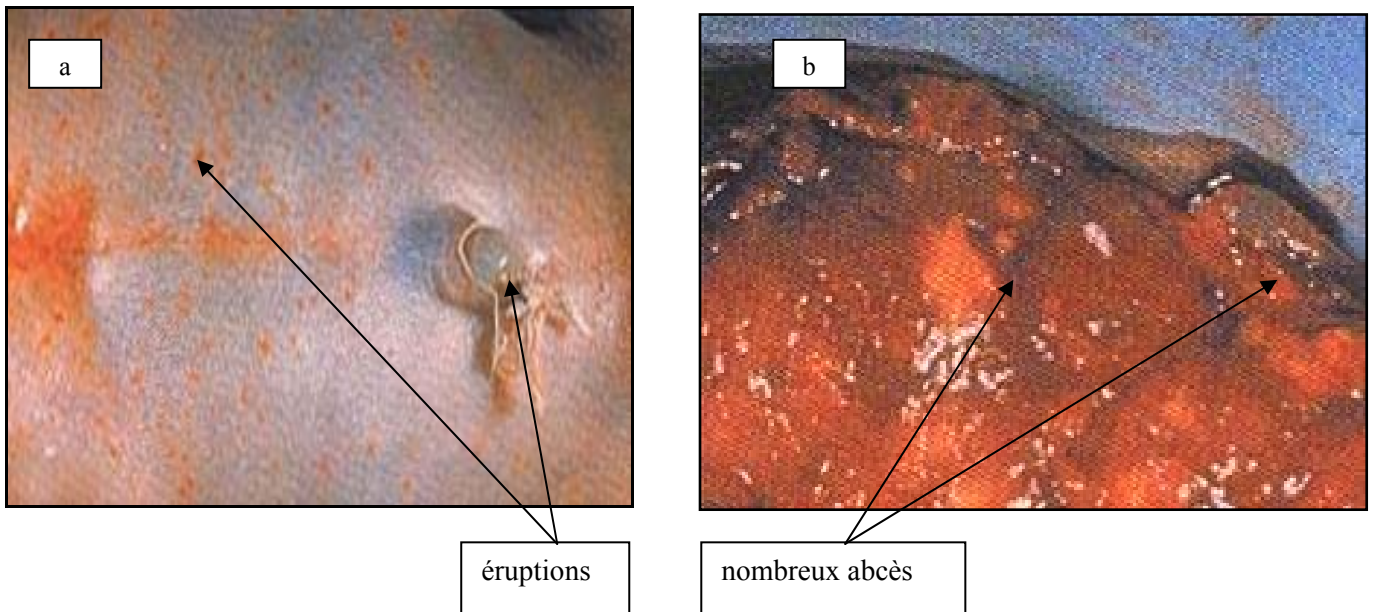
• Activité eau : Le pathogène a un Aw (Lexique 4) optimal de 0,97 et une multiplication est observable à Aw de 0,80 sur du salami. Néanmoins une étude a montré que sur du camembert, plus que l'Aw, le pH est le facteur limitant de la croissance du pathogène.

II.1.e / Pouvoir pathogène chez l'homme : (Berche, 1999; Larpent, 2000)

La porte d'entrée de l'infection est localisée aux voies aériennes (angines, pharyngites, infection pseudogrippales) et au tube digestif après absorption d'aliments contaminés. *L.monocytogenes* peut survivre à l'intérieur des cellules de l'hôte et se multiplier dans les monocytes ou les macrophages mais pas dans les polynucléaires neutrophiles. Il existe deux formes d'infection chez l'humain de ce pathogène invasif.

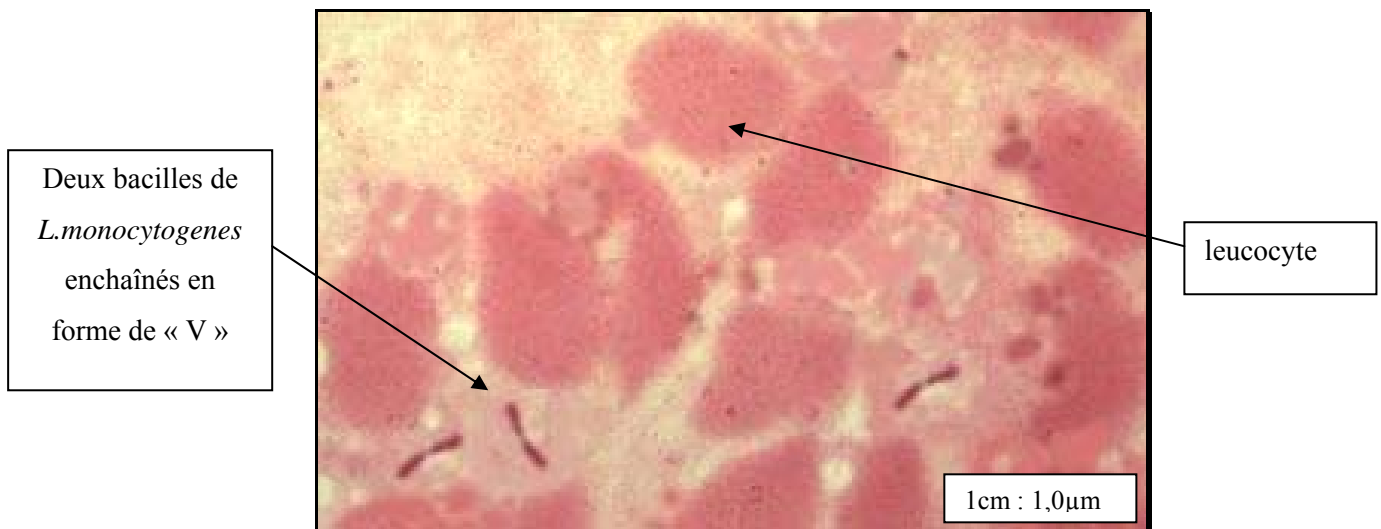
• L'infection du nouveau né et de la femme enceinte : Elle peut être précoce ou tardive. Dans les deux cas les troubles : *granulomatis infantiseptica* (Photographie 3), pneumonies, conjonctivites, hydrocéphalies, voir même retard psychologique du à une méningite, se déclarent pendant ou après la naissance en raison d'une contamination sanguine *in utero* initiée par la mère qui ne ressent aucun signe clinique pendant sa grossesse. Cette infection du fœtus entraîne un avortement (Photographie 4) ou une mortalité postnatale dans 30 % des cas ou de fréquentes séquelles neurologiques.





• Listériose adulte : Aucun symptôme ne permet de différencier une septicémie à *L.monocytogenes* d'une autre, car comme la plupart des maladies, la listériose adulte est pyrogène et dans seulement 24 % des cas, des symptômes non spécifiques sont observables : fatigue, malaises, douleurs abdominales, nausées, vomissements et diarrhées. Les immunodéprimés comme les personnes âgées, les greffés et les personnes ayant le SIDA (Lexique 7), le diabète, un cancer, une leucémie lymphatique chronique ou des problèmes d'alcoolisme, sont les plus à risque. L'évolution de la maladie conduit à une méningite, une méningo-encéphalite ou des abcès du tronc cérébral et de la moelle osseuse. Pour les cas de méningite, représentant 30 à 50 % des cas, le liquide céphalo-rachidien est purulent avec de nombreux leucocytes. (Photographie 5)





Photographie 5 : Coloration de Gram sur un liquide céphalo-rachidien de méningite à *L.monocytogenes*

<http://www.microbes-edu.org/professionnel/diag/listeria.html>

II.1.f / Facteurs de virulence :

Le pathogène sécrète différentes substances extracellulaires jouant un rôle dans sa virulence. (Berche, 1999; Larpent, 2000)

- une listériolysine O : Cette toxine de 58 kDa (Unité 1) est codée par le gène chromosomique *hly A* et est responsable du caractère β hémolytique sur gélose au sang (5 % de sang de cheval ou de mouton) en se fixant au cholestérol de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes en pH acide et indépendamment de la température.
- une internaline : Cette protéine membranaire de 80 kDa est responsable de l'attache et de l'entrée de la bactérie dans les cellules de mammifères.
- deux phospholipases : une phospholipase C zing dépendante de 29 kDa et une phosphatidylinositol de 36 kDa qui dégradent différents lipides organiques.
- une catalase et une superoxyde-dismutase : Ces deux enzymes pourraient protéger la bactérie de l'oxydation des macrophages et des polynucléaires après l'entrée dans la cellule.
- une métalloprotéase : L'activité de cette enzyme de 57,4 kDa codée par le gène *mlp* reste à être défini dans le processus de virulence.
- une protéine P60 : Elle joue un rôle dans l'invasion des cellules embryonnaires.
- deux composants de surface : Le MPA et l'ISA (Lexique 8 et Lexique 9) ont un rôle dans la suppression de la capacité des lymphocytes de la rate à former des anticorps contre les antigènes homologues de la bactérie.



II.1.g / Moyen de lutte :

En 1992, le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, propose qu'en se qui concerne les produits de la pêche non traités thermiquement, *L.monocytogenes* doit être inférieur à 100UFC (Unité 2) et ceci jusqu'à la DLC (Lexique 10) du produit. Pour respecter cela, il existe plusieurs méthodes de destruction de *L.monocytogenes* dans le domaine de l'agroalimentaire. (Larpent, 2000)

• Températures : Les différents procédés de Pasteurisation réduisent le nombre de *L.monocytogenes* à des niveaux appréciables pour la santé humaine. Néanmoins, l'acquisition d'une thermorésistance est observable en laboratoire après un chauffage à 48°C pendant 20 min.

• pH : Des additifs amenant le pH à des valeurs différentes de celles de la gamme des pH cardinaux du pathogène, sont utilisables pour la conservation. Par exemple, l'acide acétique, l'acide lactique et l'acide citrique peuvent inhiber la croissance à n'importe quelle température si le pH est inférieur à 4,39 : pH minimal de croissance de *L.monocytogenes*. Il est à noter que des acides organiques comme l'acide benzoïque et para-aminobenzoïque sont les plus inhibiteurs que ces acides minéraux.

• Antiseptiques et désinfectants : Le peroxyde d'hydrogène augmente la destruction thermique des *Listeria*, mais peut, dans du lait, créer un milieu sélectif d'enrichissement. La chloramine (en milieu acide), le chlore, les ammoniums quaternaires et les iodophores sont listéricides. Dans tous les cas, il faut respecter une concentration, un temps de contact et une température.

• Irradiation : Avec des rayons gamma, les valeurs de D (Lexique 11) sont de 0,28 à 0,61 kGy. (Unité 3) Les *Listeria* sont au moins aussi résistantes que *Salmonella thyphimurium* (D=0,28 kGy), *Staphylococcus aureus* (0,24 kGy) et *Yersinia enterocolitica* (D=0,11 kGy). De même des irradiations par ultraviolet sont efficaces à 254 nm, mais pas à 364 nm.

• Bactériocine : Des bactériocines issues de *Carnobacterium piscicola* ou *Enterococcus faecium* (entérocline A) seraient actives contre *L. monocytogenes*, mais dans l'état actuel des choses, des suppléments en bactériocines dans l'alimentation ne sont pas d'actualité. (Farber, 1993) Seul la nisine A est autorisée dans les produits laitiers. (Directive-Européenne, 1995) Néanmoins, il est possible d'utiliser des souches productrices de bactériocines, pour inhiber la croissance de *L.monocytogenes*, comme par exemple *Lactobacillus curvatus* (curvacine A), *Lb.sake* (sakacine A et K), *Lb. Pentosaceus*, *Lb plantarum* ou *Pediococcus acidilactici* (pédiocine PA-1) .

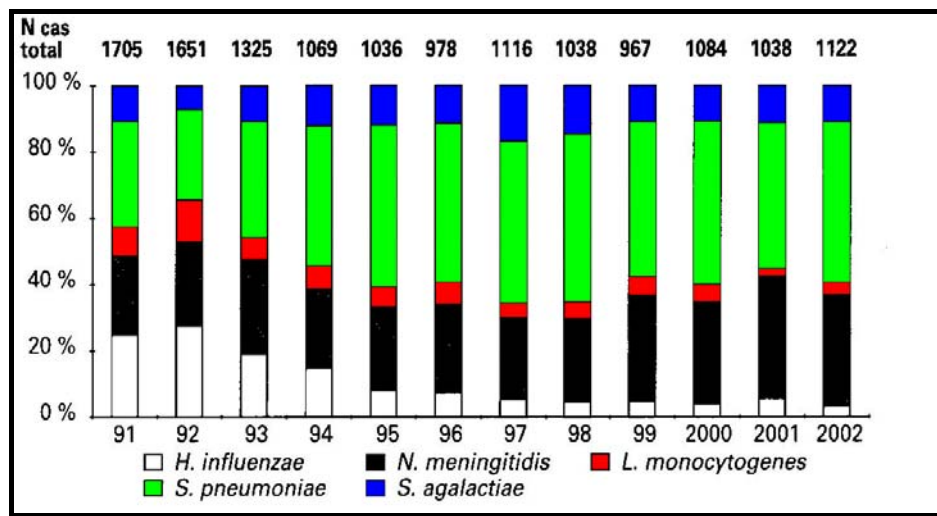
II.2 / Risque *L.monocytogenes* dans l'agroalimentaire :

II.2.a / Dans l'agroalimentaire en général :

Moins par l'eau ou l'air, la transmission du pathogène se fait essentiellement par l'alimentation. (Garland, 1995) Comme vu précédemment, *L.monocytogenes* est très virulente et a des effets très néfastes chez l'homme. De plus ces caractéristiques physiologiques lui permettent de se développer



aisément dans les produits alimentaires réfrigérés. Depuis l'épidémie de Listériose humaine provoquée à Boston en 1983, de nombreux travaux ont permis d'évaluer la fréquence de contamination des produits alimentaires. Ces études révèlent que le pathogène peut entraîner des épidémies cosmopolites à partir de produits laitiers, d'œufs, de produits carnets, de végétaux et de produits de la mer et ceci régulièrement au cours du temps. (Annexe 6) (Farber, 1993; Larpent, 2000) La France n'est pas une exception. En effet les méningites causées par *L.monocytogenes*, semblent diminuer en nombre et en proportion par rapport aux autres méningites d'origine bactérienne, mais le caractère ubiquiste de ce pathogène exclu le risque zéro (Croizé, 2000) et nous oblige à ne pas baisser notre vigilance. (Graphique 1)



(Institut-de-veille-sanitaire, 2004)

Graphique 1 : Histogramme de la proportion relative des bactéries responsables des méningites de 1991 à 2001

II.2.b / Dans l'halieutique :

Au Canada des études de destruction par la chaleur ont porté sur le homard qui est sensible à *L. monocytogenes* (Budu-Amoako et al., 1998) et des études aux USA ont indiqué que le pathogène est absent ou non détectable dans les huîtres. (Larpent, 2000) De plus, il a été démontré que *L.monocytogenes* contamine fréquemment la chair de crabe, la crevette et le saumon. (Farber, 1993) Parallèlement, aux USA d'autres travaux confirment que, la peau du saumon, dont la chaire est saine, peut être contaminée et souillée cette dernière pendant les procédés de transformation. (Eklund et al., 1995) Effectivement, des études espagnoles ont démontré que les caractéristiques de la chaire du saumon (en valeur approximatives : pH=6 ; Aw=0,96 ; NaCl=4,5%) sont très favorables au développement de *L. monocytogenes*. (Gonzalez-Rodriguez et al., 2002)



II.3 / Etudes de l'AFSSA sur *L.monocytogenes* :

Face au risque que représente *L.monocytogenes* dans l'agroalimentaire, l'AFSSA s'est auto-saisie le 7 avril 2000 pour évaluer les risques liés à ce pathogène. Dans le cadre de cette réflexion, les laboratoires de l'AFSSA se penchent, notamment, sur la classification des aliments en fonction de leur sensibilité à *L.monocytogenes*, ceci, en prenant en compte les caractéristiques Physico-chimiques de l'aliment, le traitement qu'il a subi pendant sa fabrication et sa durée de conservation. Des critères de classification ont donc été décrits suite à l'avis de l'AFSSA relatif à la classification des aliments selon le danger représenté par *L.monocytogenes*. (Hirsch, 2001) Trois types d'aliments ont été défini :

- « les aliments à risque maîtrisé » : pour les produit exempts de *L.monocytogenes* du fait de traitement lors de la fabrication (traitement thermique de 2 min à 65°C, ionisation à 5kGy, traitement listéricide), et d'une consommation selon les recommandations d'usage.

- « les aliments sûrs » : pour les aliments dont les caractéristiques ne permettent pas un développement de *L.monocytogenes* au dessus du seuil de réglementaire.

- « aliments sensibles » : pour les aliments, dont une contamination par *L.monocytogenes* au cours de la transformation ou de la commercialisation, peut entraîner un développement de celle-ci au dessus des seuils réglementaires.

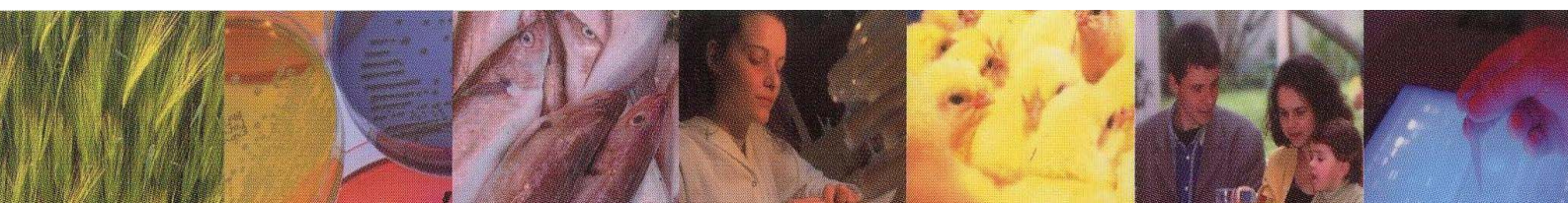
Sur l'aliment testé, est réalisé des testes de croissance (ou challenge tests ou test d'épreuve) pour étudier la capacité du pathogène à ce multiplier. Ceci dans le but d'obtenir des informations afin de pouvoir considérer, ou pas, l'aliment comme présentant un risque de santé publique.

Toujours selon l'avis de l'AFSSA précédemment cité, la classification d'un aliment peut se faire grâce à un arbre de décision (Annexe 7) qui s'appuie sur des tests de croissance dit de phase 1 et de phase 2.

- Test de croissance de phase 1 : Il consiste à connaître la capacité de *L.monocytogenes* à se multiplier dans l'aliment considéré, en l'inoculant artificiellement avec une souche connue. Ce test ne s'applique qu'à des aliments pour lesquels on ne connaît pas avec certitude l'aptitude de la croissance de *L.monocytogenes*. Il est considéré comme positif si une croissance du pathogène est observable après la durée d'incubation déterminée selon les recommandations stipulées dans l'avis. (Annexe 8)

- Test de croissance de phase 2 : Il s'applique aux aliments positifs au test de phase 1 ou aux aliments pour lesquels on sait que *L.monocytogenes* peut s'y multiplier. Ce test consiste à étudier, après inoculation artificielle de l'aliment, le développement du pathogène considéré dans des conditions vraisemblables d'utilisation. (à la fabrication, à la commercialisation et après l'achat) Son but est de déterminer si l'aliment étudié est « sensible », et le cas échéant, de permettre aux industriels de valider les DLC qu'ils ont défini au préalable par des tests de vieillissement et de conservation.

Le laboratoire de l'AFSSA à Boulogne sur mer étant spécialisé dans les produits de la mer, les travaux que j'ai effectués pendant mon stage ont porté sur ce domaine et tout particulièrement sur un test de



croissance appliqué à du saumon salé, dont le protocole issu de l'avis de l'AFSSA, est adapté suivant les caractéristiques de cette matrice et les caractéristiques des expérimentations qui lui sont appliquées. De plus, comme vu précédemment, *L.monocytogenes* est apte à se multiplier dans le saumon. Par conséquent, le test de croissance de phase 1 n'est pas nécessaire et l'étude suivant débute directement à la phase 2.

III / Matériels et Méthodes :

Après des tests de croissance réalisés sur du saumon cru, du saumon fumé et du saumon salé à l'aneth, le stage que j'ai effectué a porté sur du saumon salé, ceci en conservant le même protocole que les études précédentes.

III.1 / Préparation de l'étude :

III.1.a / Traitement du saumon salé :

Le saumon d'atlantique (*Salmo salar*) salé utilisé proviennent d'une entreprise du Boulonnais. Après filetage au CEVPM (Lexique 12), les filets sont mis sous-vide et rapportés à l'AFSSA pour que débute les expérimentations. Dans un premier temps une partie des filets non inoculés artificiellement par *L.monocytogenes* est remis sous-vide dans le but de suivre la flore totale naturelle du produit et vérifier si ce dernier ne contient pas une souche de *L.monocytogenes*. Dans tel cas, le suivi de la souche inoculée artificiellement serait compromis.

La seconde partie des filets est utilisée pour l'inoculation artificielle et est divisée en trois groupes :

- saumon frais : ensemencé en sortie d'usine pour simuler une contamination survenue en fin de production.
- saumon vieilli : ensemencé après 2 semaines à 8°C dans le but d'augmenter à un niveau important la flore naturelle du produit.
- saumon ionisé : ensemencé après une irradiation par rayons β à 10kGy faite par la société Ionisos d'Orsay, dans le but de réduire à un niveau quasi nul la flore naturelle du produit.

Les testes de croissances sur le saumon vieilli et ionisé vont permettre de prendre, ou non, en compte la flore naturelle, afin d'étudier les éventuelles relations entre *L.monocytogenes* et la flore naturelle du saumon.

III.1.b / Les souches utilisées :

Les trois matrices précédentes sont inoculées séparément par deux souches de *L.monocytogenes*. L'une provient d'une collection de l'Institut Pasteur : CIP 78.38 sérovar 4b (appelée par la suite CIP) et l'autre d'une collection de l'AFSSA : E 1012PT1. (appelée par la suite E) Cette dernière a été isolée



à partir de saumon fumé. Le but est de vérifier si une *L.monocytogenes* issue de la filière pêche se comporte comme une souche de référence, utilisée dans différentes autres études.

III.1.c / Préparation de l'inoculum :

Avant inoculation, les deux souches sont incubées 10 jours à 8°C dans du BCC (Composition de milieu 1) car ce couple temps température permet d'obtenir une population bactérienne en phase stationnaire, (Figure 3) ceci dans le but de conserver une certaine répétabilité dans les différents tests de croissance réalisés.

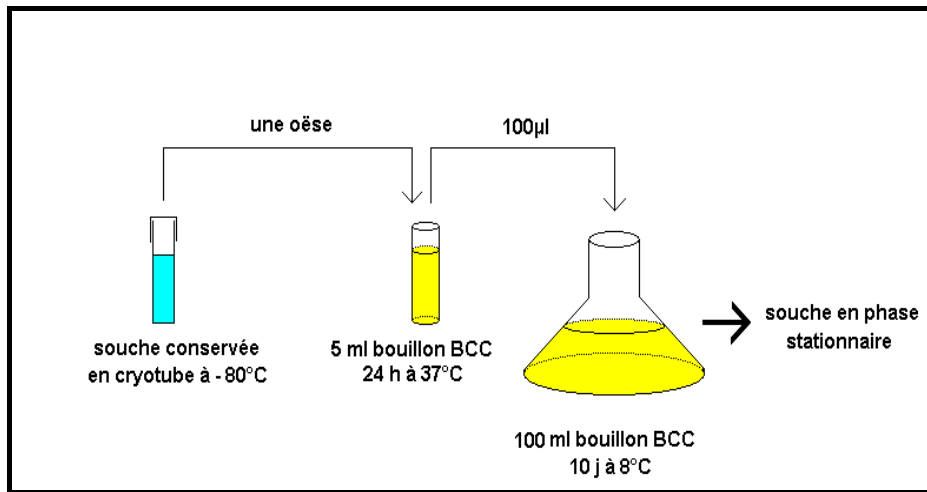


Figure 3 : Mise en phase stationnaire de souche de *L.monocytogenes*.

Ainsi, à partir de cette culture, est préparée une suspension bactérienne dans de l'eau physiologique, utilisée pour l'inoculation des matrices. (Figure 4)

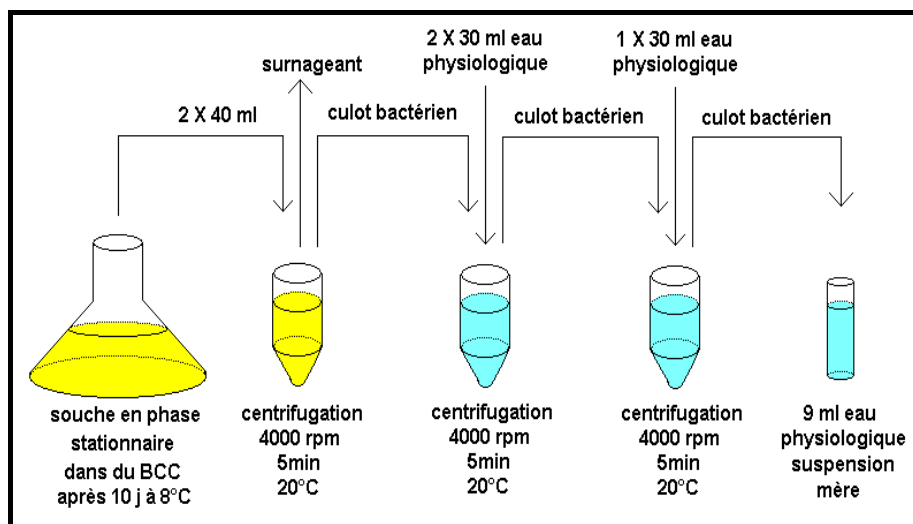


Figure 4 : Préparation de la suspension de *L.monocytogenes*.



C'est cette dernière solution qui permet d'inoculer les matrices à des concentrations de :

- 1000 UFC/g : recommandation de l'avis de l'AFSSA.
- 100 UFC/g : concentration maximale tolérée.
- 10 UFC/g : empiriquement le taux de contamination habituel.

Pour se faire, la concentration de la solution mère est déterminée par spectrophotométrie moléculaire dans le but de préparer une solution fille permettant d'inoculer des matrices de 25g sous 50µl aux concentrations souhaitées. (Annexe 9)

III.1.d / Méthode d'inoculation des matrices :

Le saumon frais et vieilli est conservé sous vide à 4°C et déconditionné au moment de l'inoculation. Après inoculation et avant reconditionnement sous vide, les échantillons sont repliés sur eux-mêmes et dépliés pour homogénéiser le dépôt de bactéries. La méthode d'inoculation du saumon ionisé est identique, mais ce dernier est expédié congelé à -21°C, pour ionisation et revient dans le même état. Avant inoculation, il est ainsi décongelé à 4°C pendant 24h. Cette congélation est utilisée pour minimiser au maximum le développement de la flore naturelle du produit.

III.1.e / Conservation des matrices inoculées :

Cette étude se proposant de suivre le développement de *L.monocytogenes* dans des conditions vraisemblables de commercialisation du saumon, ce dernier est conservé successivement aux couples temps/température suivants :

- 4°C pendant 7 jours : conditions de préparation en usine et du trajet entre l'industriel et la distribution.
- 8°C pendant 7 jours : conditions de conservation des linéaires de la distribution.
- 20°C pendant 2 heures : conditions de transport entre l'achat par le consommateur et l'arrivée dans un réfrigérateur ménagé.
- 8°C pendant plus de 7 jours : conditions de conservation dans un réfrigérateur ménagé.

L'étude se fait sur une période de 21 jours correspondant à la DLC pratiquée par les industriels à partir des premiers instants de manipulation en usine. Néanmoins, l'étude est poussée jusqu'à 28 jours pour apprécier les cinétiques de croissance. Ainsi, les cinétiques de croissance de *L.monocytogenes* sont observées « de l'étable à la table », c'est à dire de la production à la consommation en passant par la distribution.



III.2 / Analyses réalisées :

III.2.a / Analyses Physico-chimiques réalisées :

Trois analyses physico-chimiques sont réalisées pour caractériser la nature du saumon salé utilisé pour les tests de croissance :

- Teneur en matière grasse totale : Réalisé suivant la norme NF V04-402. La matière grasse est extraite dans un soxhlet au moyen d'éthanol absolu après hydrolyse à chaud par de l'acide chlorhydrique concentré afin de libérer les fractions lipidiques occluses et liées. La masse de lipide, est obtenue après dessiccation du résidu d'extraction.

- La teneur en humidité : Réalisé par dessiccation en étuve suivant la norme NF V04-401. Après broyage, la dessiccation est réalisée à 100°C jusqu'à poids constant et la teneur en eau évaporée est obtenue par différence entre le poids de l'ensemble (nacelle de pesé+5g d'échantillon+5g de sable) avant et après dessiccation.

- La teneur en chlorure : Réalisé par une technique non conventionnelle, dans laquelle un volume précis, (0,5ml) issu de l'échantillon, (2,5g dans 247,5ml d'eau) est additionné à une solution d'acide combiné. Un Chloromètre titre automatiquement les ions chlorures par passage entre les deux électrodes argentées qui assurent une génération constante d'ions argent. Durant la période de titration, les ions argents se combinent avec les ions chlorures pour former un précipité de chlorure d'argent maintenu en suspension. Les ions argents en excès apparaissent à la fin de la réaction et modifie la conductivité de la solution. Cette différence est détectée par les deux électrodes et le dosage s'arrête. Le résultat est donné en g de chlorure pour 1000g de produit et multiplié par 10 pour l'obtenir de %.

III.2.b / Dénombrement de *L.monocytogenes* sur les échantillons inoculés :

La technique utilisée n'est pas conventionnelle mais découle de la norme NFV08-051. (Figure 5) Elle permet de suivre l'évolution dans le temps de la concentration des matrices en *L.monocytogenes* inoculées artificiellement. Pour ce faire les dilutions, permettant de visualiser une quantité dénombrable de bactéries, sont réalisées au cas par cas pour l'ensemble des essais. (le moment du prélèvement, la nature de la matrice et la souche dénombrée sont variables)



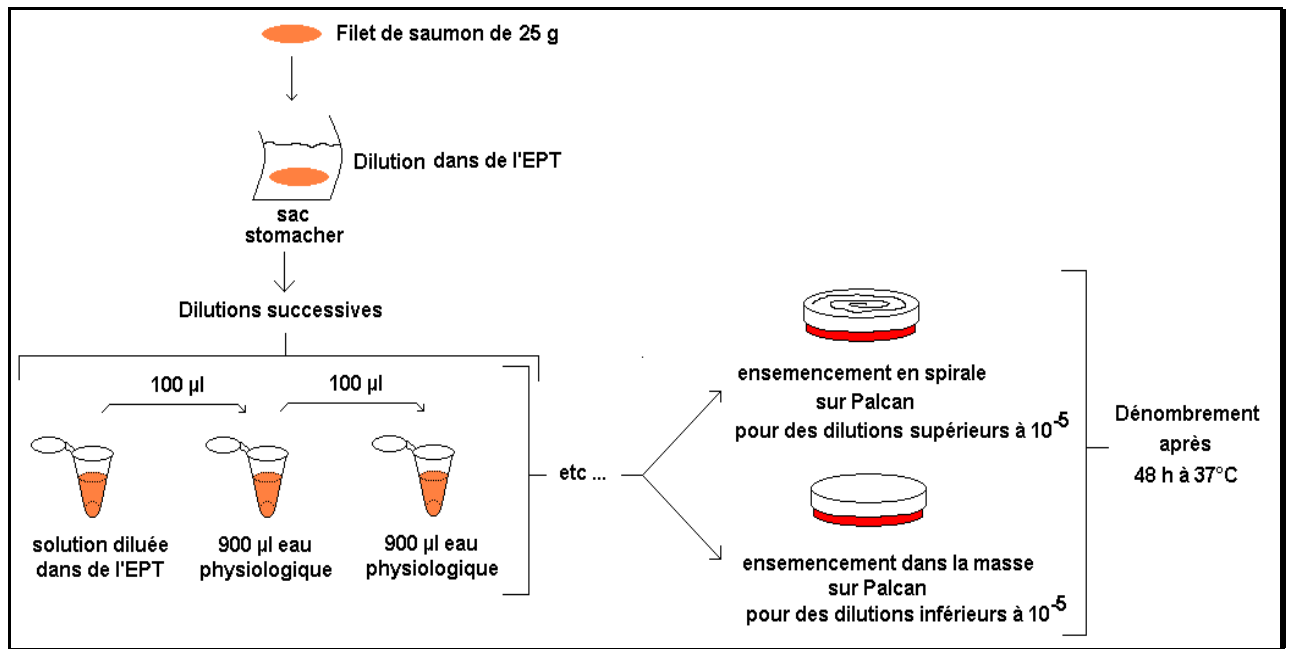


Figure 5 : Technique non conventionnelle de dénombrement de *L.monocytogenes*

(Composition de milieu 2 et Composition de milieu 3)

Remarque : Cette technique est réalisée sur deux échantillons pour que chaque point, réalisé aux instants t de l'étude, soit représenté par deux essais. Ainsi les résultats obtenus se rapprochent d'avantage de la réalité. De plus, pour être certain de pouvoir dénombrer après incubation, les deux dernières dilutions du portoir sont ensemencées.

III.2.c / Détection et dénombrement de *L.monocytogenes* sur les échantillons non inoculés :

Il est utilisé la norme NFV08-055 (Figure 6) pour la détection et le dénombrement de *L.monocytogenes*. Réalisée ponctuellement sur les échantillons frais et vieilli non inoculés artificiellement, cette technique de « détection dénombrement » accréditée COFRAC, (**Lexique 14**) permet de vérifier que la matrice étudiée n'est pas contaminée naturellement, et par conséquent, que les dénombrements, précédemment décrits, ne suivent que le développement de *L.monocytogenes* inoculé artificiellement.



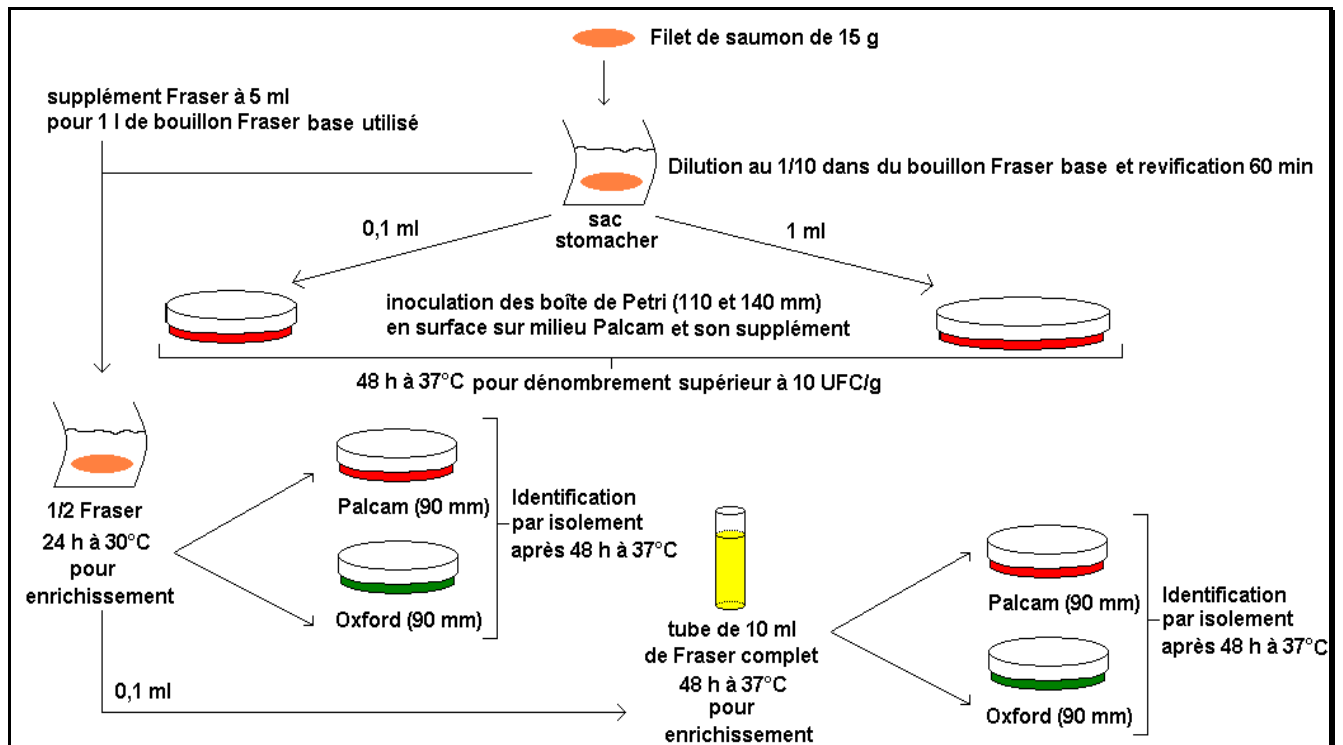


Figure 6 : Méthode de détection et dénombrement de *L.monocytogenes*, issue de la norme NFV08-055

(Composition de milieu 4 et Composition de milieu 5)

Remarque : les colonies caractéristiques à centre noir sur Palcam et Oxford doivent, le cas échéant, être utilisées pour confirmer la présence de *L.monocytogenes* par une méthode tel que l'hybridation ADN/ADN ou ARN/ARN (Lexique 15)

III.2.d / Dénombrement de la flore totale :

La technique utilisée est accréditée COFRAC, et suit la norme NFV08-051.(Figure 7) Le suivi des microorganismes aéroanaérobie facultatifs à 30°C, réalisé sur les échantillons frais et vieillis, permet d'obtenir des informations sur le développement de la flore naturelle du saumon.



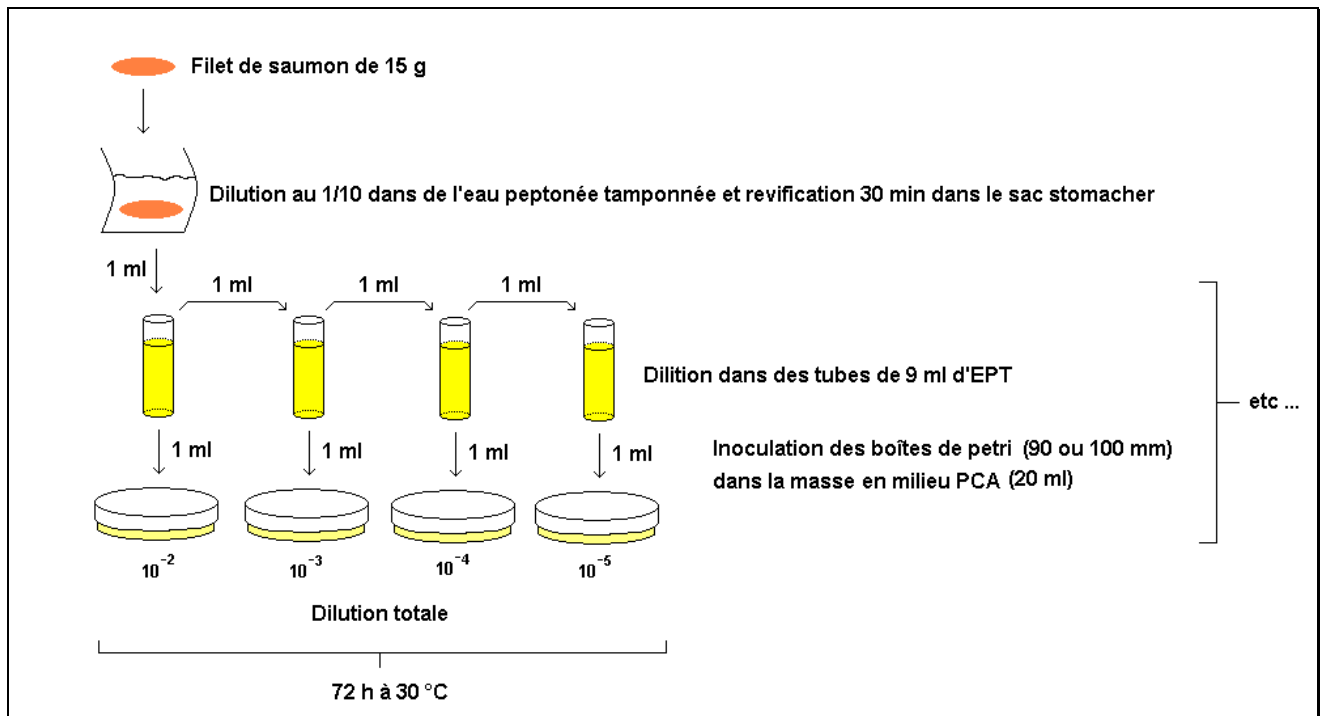


Figure 7 : Méthode de dénombrement des microorganismes aéroanaérobie facultatifs à 30°C, issue de la norme NFV08-051

(Composition de milieu 6)

III.3 / Traitement des résultats :

III.3.a / Etablissement des courbes de croissance :

Les courbes de croissance des tests de croissance sont représentatives de la fonction :

$$\text{Log } N = f(t)$$

Avec N : population bactérienne (Lexique 16)

t : temps (h)

Le passage d'une des dimensions de la fonction en semi logarithme décimal permet de visualiser correctement les différentes phases de croissance. En effet, un échelle décimale sur les deux dimensions ne permet pas de visualiser aisément la pente de la phase exponentielle de croissance.

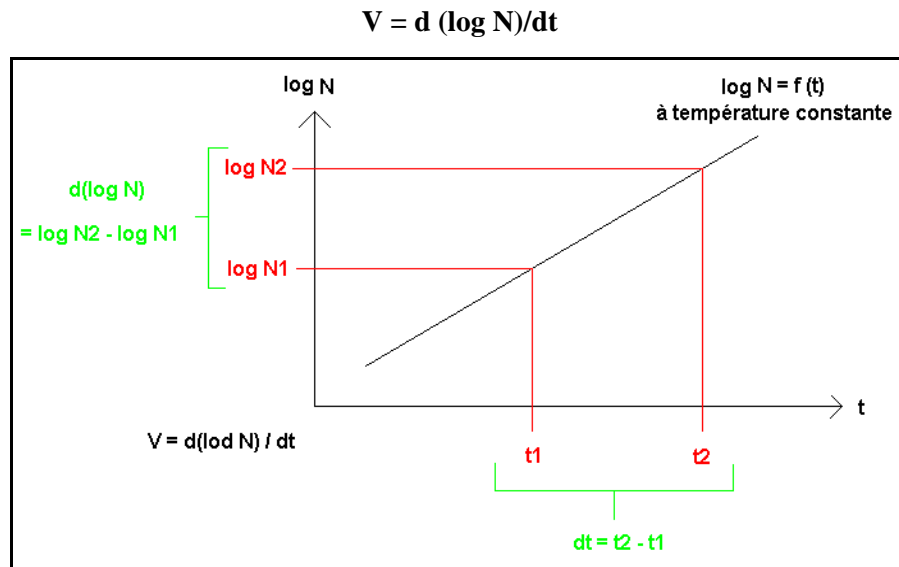
Remarque : Pour les points issus de deux essais sur deux échantillons, les courbes sont réalisées en calculant la moyennes des log N calculés.

III.3.b / Calcul des indicateurs de croissance :

Pour comparer les résultats, différents indicateurs sont calculés pour chaque phase de température appliquée aux matrices. (4,8,20 puis 8°C)

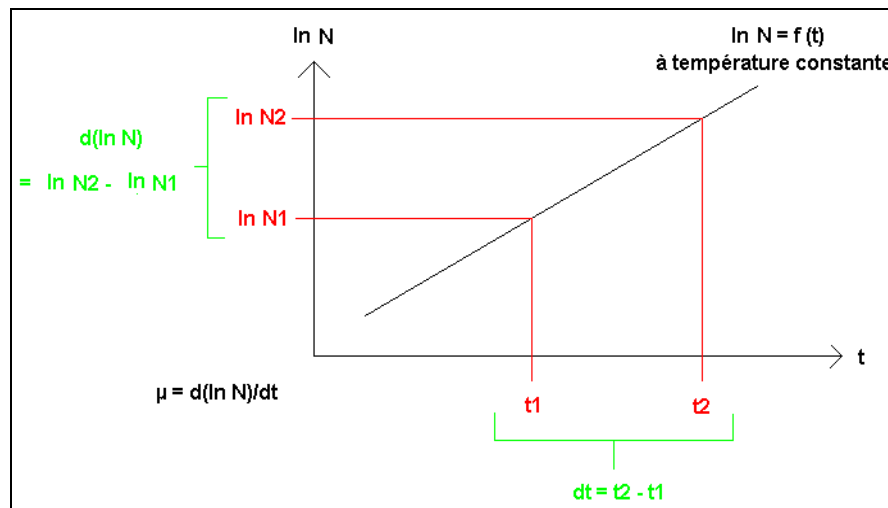


• Vitesse de croissance V (UFC.g⁻¹.h⁻¹) (Lexique 17) : représente l'évolution du logarithme décimal de la population en fonction du temps. Elle est calculée en déterminant, par régression linéaire, la pente de la droite représentative de la fonction $\text{Log } N = f(t)$ aux différentes phases de température constante. (Graphique 2)



Graphique 2 : Calcul de la vitesse de croissance V

• Taux de croissance μ (UFC.g⁻¹.h⁻¹) (Lexique 18) : représente l'évolution du logarithme népérien de la population en fonction du temps. Il est calculé à partir de V. (Graphique 3)



Graphique 3 : Calcul du taux de croissance μ

$$\mu = d(\ln N)/dt$$

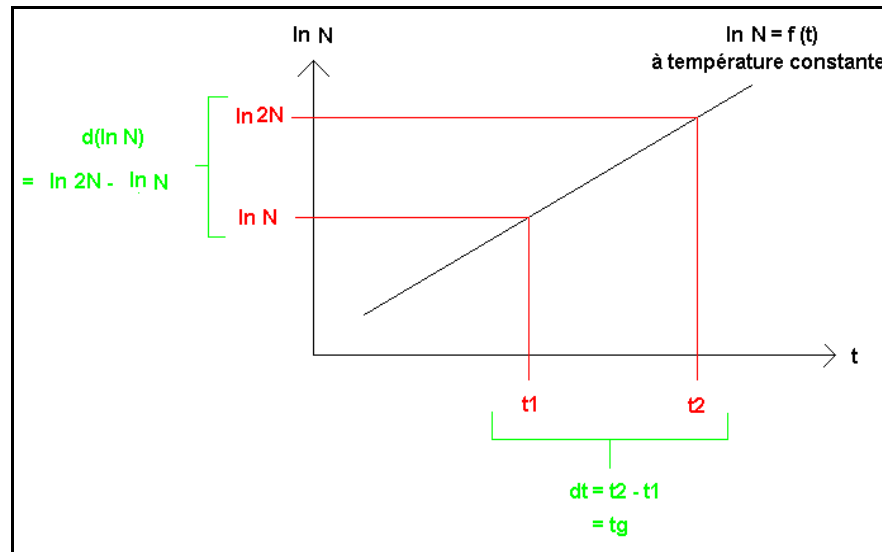
$$\mu = d(\log N)/dt \times \ln(10) \text{ car } \ln N = \log N \times \ln(10)$$

$$\mu = V \times \ln(10)$$

$$\mu = 2,3 V$$



• Temps de génération tg (h) (Lexique 19) : représente le temps moyen de doublement de la population. Il est calculé à partir de la relation entre V et μ , puis appliqué à sa propre définition. (Graphique 4)



Graphique 4 : Calcul du temps de génération tg.

$$V = \mu / \ln(10)$$

$$V = [d(\ln N) / dt] / \ln(10)$$

$$V = [\ln(2N) - \ln(N) / tg] / \ln(10)$$

$$tg = [\ln(2N) - \ln(N)] / V \cdot \ln(10)$$

$$tg = [\ln(2N/N)] / V \cdot \ln(10)$$

$$tg = \ln(2) / V \cdot \ln(10)$$

$$tg \approx 0,301 / V$$

IV / Résultats:

IV.1 / Croissance de *L.monocytogenes* dans du saumon salé :

IV.1.a / Détermination de la nature Physico-chimique du saumon salé :

Les analyses Physico-chimiques réalisées sur le saumon salé étudié, indiquent les valeurs suivantes :

Taux de sel : 2,0 % de NaCl

Taux d'humidité : 60,0 %

Taux de matière grasse : 11,24 %



IV.1.b / Contrôle du bon déroulement du test de croissance :

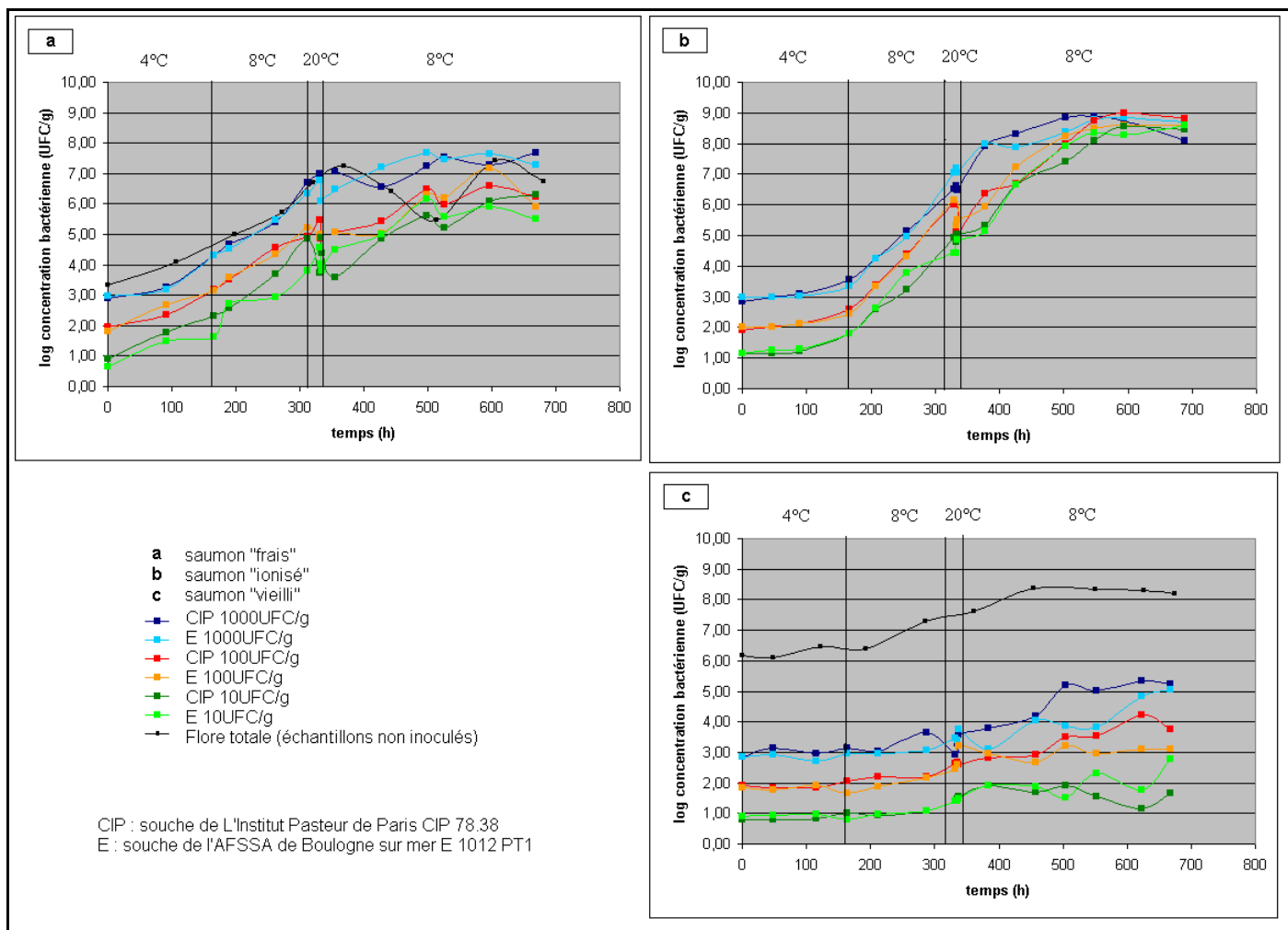
La vérification de la concentration bactérienne des suspensions d'inoculation donne des résultats (non fournis) conformes, indiquant que les trois concentrations d'inoculation choisies (10, 100 et 1000UFC.g⁻¹) ont été respecté pour les saumons « frais », « vieillis » et « ionisés ». De plus la détection de *L.monocytogenes*, réalisée sur le saumon « frais » et « vieilli » non inoculés artificiellement, s'est avérée négative sur les 17 échantillons testés. (résultats non fournis). Les dénombrements des souches inoculées reflètent donc bien la cinétique de croissance de cette dernière, car aucune souche naturelle n'est présente initialement, durant et jusqu'à la fin des tests de croissances.

Remarque : La détection de souche de *L.monocytogenes* naturelle sur le saumon ionisé n'est pas réalisée car le traitement de ce dernier (10kGy de rayon β) rend impossible la survie du pathogène.

IV.1.c / Comparaison des deux souches :

Que ce soit pour le saumon « frais », « vieilli » ou « ionisé », les cinétiques de croissances des deux types de souches ont la même allure, et ceci pour les trois inoculations à 10,100 et 1000UFC.g⁻¹. (Graphique 5)





Graphique 5 : Cinétiques de croissances de *L.monocytogenes* (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g⁻¹ sur le saumon salé.

A priori, la souche de *L.monocytogenes* issue du milieu marin aurait le même comportement que la souche de référence déjà connue. Néanmoins pour la fin de la cinétique de croissance de la matrice « vieilli », des écarts pouvant aller jusqu'à 1log, sont remarquables entre les souches d'un même inoculum. Cette divergence n'est pas visible pour les saumons « frais » et « ionisé ».

IV.1.d / Comparaison des inoculum :

Pour les trois matrices étudiées, les dénombrements des inoculations à 10, 100 et 1000UFC.g⁻¹ se suivent au cours du temps avec un écart constant d'environ 1log, ce qui correspond à la différence de concentration des trois inoculation : 10 UFC.g⁻¹. (Graphique 5) Ceci n'est pas toujours vérifié pour les saumons « frais » et « ionisé », où cet écart de 10 UFC/g entre les inoculum diminue à partir de 400h. (environ 17jours) Il est aussi intéressant de noter qu'après le passage à 20°C, cet écart entre les inoculum du saumon « vieilli », passe de 1log à des valeurs variables.



IV.1.e / Comparaison des matrices :

Pour comparer plus aisément les croissances de *L.monocytogenes* sur chaque matrices en fonction des phases de température, les résultats des calculs des temps de génération tg (Figure 8) sont corrélés avec les cinétiques de croissance. (Graphique 5)

L'utilisation des vitesses de croissance V et des taux de génération μ , pour comparer les croissances de la bactérie, donneraient les mêmes interprétations qu'avec les temps de génération tg, car leur calcul est issu de variables identiques. (population bactérienne N et temps t) Néanmoins, les tg sont conservés pour les comparaisons, car les valeurs des V et μ sont toutes comprises entre 0 et 1, et par conséquent moins aisément utilisables que les tg dont les valeurs sont encadrées par des limites plus étendues.

	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
frais	4°C	35,9	37,9	41,3	36,9	35,1	49,6
	8°C	18,8	20,4	23,1	26,0	24,5	20,8
	20°C	-11,8	-1,1	-1,3	9,1	2,0	-1,8
	8°C	165,7	118,6	71,6	62,1	41,5	57,1
	vieilli	4°C	309,4	4154,5	413,0	-604,5	235,8
8°C		932,0	107,9	106,0	66,1	137,8	89,5
20°C		2,1	5,0	-85,1	1,8	7,7	121,1
8°C		53,1	65,2	68,5	1985,4	-319,2	130,4
ionisé		4°C	69,2	128,8	74,0	112,4	79,0
	8°C	17,2	13,6	14,4	13,3	15,9	18,4
	20°C	-44,1	-192,4	-1,3	12,8	12,8	3,4
	8°C	73,6	94,2	26,8	27,6	27,6	25,8

Remarque : Les chiffres négatifs (grisés) doivent être considérés comme nuls car ils sont issus du calcul d'une pente négative, représentant une vitesse de croissance qui elle ne peut être négative. Ceci s'explique car le calcul d'une pente sur une phase de latence ou une phase stationnaire donne un résultat proche de 0 et donc pouvant être négatif.

Figure 8 : Tableau récapitulatif des calculs de temps de génération tg (h) pour l'étude du saumon salé

En ce qui concerne la phase à 20°C, les tg sont très variables et ceci pour les trois matrices, ce qui rend les comparaisons délicates. Néanmoins, aucune augmentation significative n'est observable pendant cette phase.

Pour celles à 4°C, la première à 8°C et la seconde à 8°C du saumon « vieilli », les tg sont nuls voir relativement importants : de 53,1 à 1985,4h (Figure 8), ce qui indique une croissance très lente voir inexistante. Au contraire, dans le saumon « ionisé » et le saumon « frais », une phase de croissance exponentielle est observable pour chaque inoculum pendant la première phase à 8°C, avec des tg allant de 18,8 à 26,0h pour le « frais » et de 13,3 à 18,4h pour le ionisé. (Figure 8) Cette légère différence



entre le saumon « frais » et le saumon « ionisé », est aussi observable graphiquement, (Graphique 5) car quelque soit l'inoculation, la pente de la phase exponentielle du saumon « frais » est toujours plus faible que celle du « ionisé ». Ce qui explique que l'on n'ait des tg plus fort pour le saumon « frais » que pour le saumon « ionisé », car les tg sont inversement proportionnels aux pentes déterminées par régression linéaire. Pendant cette phase, *L.monocytogenes* se développe donc d'avantage dans le saumon « ionisé » que le saumon « frais ».

Pour la seconde phase à 8°C, les tg des trois matrices sont importants : de 25,8 à 130,4h voir nul (Figure 8), indiquant une croissance proche de la nullité. En effet, cette phase coïncide pour le saumon « vieilli » à un phase de très faible croissance et à la l'apparition de la phase de latence pour le saumon « frais » et « ionisé ». En effet, une phase de ralentissement est nettement observable juste après le passage à 8°C pour le saumon « ionisé ». (Graphique 5)

En ce qui concerne la phase à 4°C, une grande différence apparaît entre le saumon « frais » et « ionisé ». Les tg du saumon « frais » vont de 35,1 à 49,6h et ceux du saumon « ionisé » vont de 69,2 à 128,8h (Figure 8), ce qui correspond à une légère phase exponentielle et une phase de latence. (Graphique 5)

Par ailleurs, il est à noter que les concentrations maximales atteintes dans le saumon « ionisé » sont supérieures (entre 8 et 9 log) à celles des saumons « frais » (entre 6et 8 log) et « vieilli ». (entre 2 et 5 log)

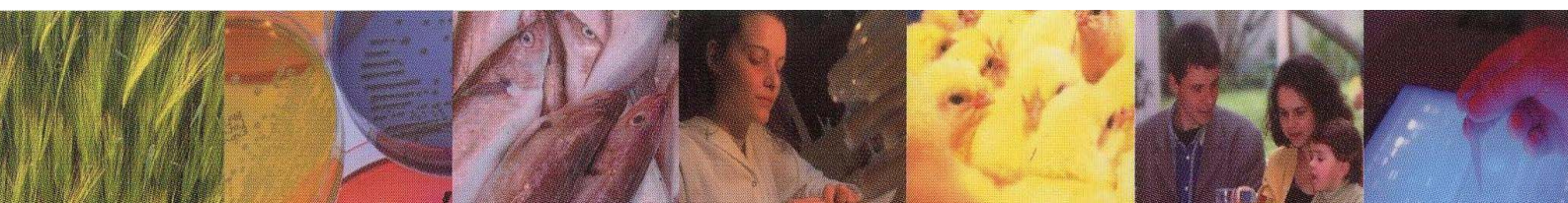
IV.1.f / Comparaison du développement des flores totales :

Pour le saumon frais non inoculé par *L.monocytogenes*, la flore totale augmente au cours du temps en passant de 3,5 à 7,5log. A contrario, pour le saumon « vieilli », cette flore totale naturelle augmente de 6 à 8,5log. (Graphique 5) La flore totale du saumon « vieilli » est, pendant l'étude, constamment supérieure à celle du saumon « frais ». En effet ce résultat fait référence au vieillissement du saumon à 8°C pendant 15j qui à été réalisé dans ce but. Par ailleurs, au moment de la seconde phase à 8°C, il est remarquable pour le saumon « frais », que l' arrive en phase de latence de *L.monocytogenes*, coïncide exactement à l'arrivée en phase de latence de la flore totale. Ceci est valable pour les deux souches et les trois inoculum.

IV.2 / Croissance de *L.monocytogenes* dans du saumon cru, fumé et salé à

l'aneth :

Avant mon stage, des tests de croissance ont été réalisé sur du saumon cru, fumé, et salé à l'aneth, tout en gardant le même protocole, pour permettre des comparaisons pouvant aboutir à des hypothèses quant aux relations existantes entre la croissance de *L.monocytogenes* et le mode de préparation du saumon. Pour rendre cette comparaison plus aisé, le calcul des tg a été réalisé comme précédemment, c'est à dire, à partir des régressions linéaires de chaque phase de température constante.



IV.2.a / Etude du saumon cru :

Quelque soit la matrice, *L.monocytogenes* ne se développe pas voir très peu pendant la phase à 4°C, car les tg calculés sont nuls ou très importants. (Annexe 10)

Pour les même raisons, lors de la première phase à 8°C, le pathogène a une croissance très faible voir absente dans la matrice « vieillie », alors que sur les saumons « frais » et « ionisé », une phase exponentielle est présente pour toutes les cinétiques de croissance, avec des tg allant de 20,8h à 52,6h. Il est aussi à noter, que pour cette phase de température 3 tg de la matrice « ionisée » sur 6, sont inférieurs à 3 tg du saumon « frais » sur 6, et inversement. Ceci n'indiquerait aucune différence significative, en ce qui concerne le développement de *L.monocytogenes* dans ces deux matrices pendant la phase à 8°C. Néanmoins, sur l'ensemble de la cinétique, (28j) la croissance du pathogène atteint sur la matrice « ionisé » des valeurs de 5,5 à 8,5log, qui sont supérieurs aux valeurs de 4,5 à 7,0log atteinte dans la matrice « vieillie ».(Annexe 11) Pour le passage à 20°C, *L.monocytogenes* semble ne pas se développer (tg très important ou négatif) pour la matrice « vieillie ». Ce qui n'est pas le cas dans le saumon « ionisé » où des tg allant de 0,9h à 17,2h sont observables. Pour le saumon « frais », les tg de cette phase sont très variables. Quant à la seconde phase à 8°C, les tg relativement forts, (25,4h<tg<963,7h) ne nous permettent que d'évoquer une croissance de très faible amplitude.

IV.2.b / Etude du saumon fumé :

Là encore, le pathogène ne semble pas ou très peu se multiplier durant la phase à 4°C car les tg calculés sont encore une fois nuls ou très fort. (Annexe 10)

Toujours en se référant aux tg calculés, pendant la première phase à 8°C, le pathogène a une croissance très faible voir absente dans la matrice « vieillie », alors que sur les saumons « frais » et « ionisé », une phase exponentielle est observable. Ces résultats sont aussi observables graphiquement. (Annexe 12) De plus les phases de croissance du saumon « frais » ont des tg plus important (21,6h<tg<46,4h) que ces du saumon « ionisé ». (13,7h<tg<19,6h) *L.monocytogenes* croit donc plus rapidement sur le saumon “ionise” que sur le saumon “frais”. Les tg de la phase à 20°C sont d'une telle variabilité pour les trois matrices, qu'une description des croissances entre celles-ci, en devient difficile ou même impossible. Pour la seconde phase à 8°C, la croissance semble très relative, car pour tous les inoculum, les tg calculés sont nuls ou assez importants. (27,0h<tg<177,5h) Ce qui se vérifie sur les courbes de croissances. (Annexe 12)

IV.2.c / Etude du saumon salé à l'aneth :

Pour les trois inoculum des trois matrices, les tg de la phase à 4°C indiquent une croissance inexistante ou minime. (tg=0 ou 39h<tg<3474,9h) (Annexe 10)

Quant à la première phase à 8°C, seule le saumon « frais » permet une croissance de *L.monocytogenes* car les tg de tous les inoculum sont relativement faibles. (19,3h<tg<35,1h) Au contraire, les matrices



« vieilles » et « ionisée » présentent des tg nuls ou importants, (32,0h<tg<4894,6h) indiquant, par conséquent, une croissance nulle ou très faible du pathogène. Ces remarques se vérifient, elle aussi, graphiquement. (Annexe 13) Les tg calculés pendant la phase à 20°C sont encore une fois très hétérogènes, et donc non comparables. La seconde phase à 8°C est, quant à elle, dans la majorité des cas, constituée de tg égal à 0 ou très important. Mais certains tg indiquent une croissance exponentielle. C'est le cas de la souche CIP pour les inoculum 100 et 100UFC.g⁻¹ du saumon « frais » et 100UFC.g⁻¹ du saumon « ionisé », qui a respectivement des tg respectivement de 21,5 ;21,0 et 32,0h.

V / Discussion :

Les analyses des taux d'humidité et de matière grasse sur le saumon salé, respectivement 60,0 et 11,24% (en masse), indiquent que la composition Physico-chimique du saumon analysé se rapproche d'une composition naturelle moyenne de saumon. (Annexe 14) Le saumon analysé est donc représentatif de son espèce. Par ailleurs, l'analyse du taux de sel indique 2,0% de NaCl (en masse). Or, la teneur moyenne en sodium d'un saumon non salé est de 51mg/100g de chair, soit 0,051% de Na (en masse). (Annexe 15) Si nous considérons que tout le sodium d'un saumon est sous forme de NaCl et que les masses molaires du sodium et du chlore sont de 23 et 35g.mol⁻¹, les 0,051% de Na correspondent alors au maximum à $0,051 \times 35 / 23 = 0,077\%$ de NaCl (en masse) dans du saumon non salé. Cette valeur étant très inférieure à la valeur mesurée (2,0%), le saumon sorti d'usine peut donc être considéré comme salé.

Les tests de croissance sur saumon salé nous montrent que l'écart de 1log entre les trois inoculum de 10, 100 et 1000UFC.g⁻¹ reste constant pendant les trois premières phases de température. Par conséquent, entre 10 et 1000UFC/g d'inoculation initiale, cette dernière ne serait pas fonction de la croissance de *L.monocytogenes*, car, effectivement, les cinétiques de croissance évoluent parallèlement au cours du temps. Néanmoins, la diminution de cet écart, à partir de la seconde phase à 8°C, ne réfute pas cette hypothèse. En effet, le début de cette phase de température correspond au début de la phase stationnaire pour les trois matrices étudiées. Le fait que les cinétiques de croissances des inoculum 10 et 100UFC/g rejoignent les cinétique des inoculum 1000UFC/g, signifierait que les bactéries atteignent leur niveau maximal de croissance pour les 25g d'échantillon analysés. A cet instant, elles auraient épuisé toutes les ressources énergétiques du substrat. Dans l'hypothèse où le produit est suffisamment important en taille pour apporter du substrat constamment, il n'y a donc, a priori, aucune raison que, pendant la seconde phase à 8°C, ces bactéries ne suivent pas la cinétique de croissance qu'elles ont eu durant la première phase à 8°C.

D'autre part, nous avons observé que la souche de référence (CIP 78.38. de l'Institut Pasteur de Paris) et la souche isolée de saumon (E 1012 PT1 de l'AFSSA de Boulogne sur mer) présentent des développements identiques, sauf pour la matrice « vieillie », où, pour un même inoculum, des écarts



apparaissent au cours du temps. La différence de cette matrice par rapport aux saumons « frais » et « ionisé », est la présence d'une flore nature plus importante. Cette flore pourrait expliquer l'apparition de divergences entre les deux souches d'un même inoculum. Un phénomène de compétition pourrait avoir lieu, entre cette flore naturelle du saumon et *L.monocytogenes*. En effet, d'un échantillon à l'autre, la flore totale n'est pas rigoureusement identique, car la nature de l'échantillon et le lieu de pêche du saumon dont il est issu, sont des facteurs qui varient et influencent cette flore naturelle constituée de bactéries aérobie et lactobacilles (Cortesi et al., 1997). Par conséquent, plus cette dernière se développe, plus les écarts entre échantillons sont importants au cours du temps. Ceci se répercuterait sur le degré de compétition et expliquerait les divergences observées en fin de croissance entre les deux souches inoculées sur le saumon « vieilli ». Ce phénomène de compétition peut aussi être appuyé par la comparaison des croissances entre les trois matrices. Pendant la première phase à 8°C, *L.monocytogenes* se développe beaucoup dans du saumon « ionisé » et très peu dans du saumon « vieille ». La flore naturel du saumon, qui n'est présente que dans le saumon « vieilli », semble donc inhiber le développement du pathogène. Pendant cette phase de température, le développement de *L.monocytogenes* dans du saumon « frais », est intermédiaire aux développements dans les saumons « ionisé » et « vieilli ». Effectivement, la flore totale du saumon « frais », qui est plus faible que celle de la matrice « vieillie », inhiberait, comme dans cette dernière matrice, *L.monocytogenes*, mais d'une façon moins importante. Ce phénomène d'inhibition de *L.monocytogenes* par la flore naturelle du saumon, a été démontré dans une autre étude, qui arrive à la conclusion que le développement du pathogène dans du saumon fumé conditionné sous vide est d'autant plus important que le poisson est de bonne qualité microbiologique. (Rorvik et al., 1991). De plus nous avons observé, qu'au début de la seconde phase à 8°C, *L.monocytogenes* arrive en phase de latence au même moment ou la flore naturelle du saumon arrive, elle aussi, en phase de latence. Ce phénomène a déjà été décrit sous le nom « d'effet Jameson » en 1962 dans une étude concernant le développement de *Salmonella* sur des aliments. (Ross et al., 2000) Cet « effet Jameson » sur le saumon « frais » de l'étude, nous indique une nouvelle fois, que la croissance de la flore naturelle du saumon conditionne le développement de *L.monocytogenes*, en ralentissant la croissance de ce pathogène. Effectivement les concentrations maximales atteintes, pendant l'étude, sont plus élevées pour le saumon « ionisé » que pour le saumon « frais » et de surcroît pour le saumon « vieilli ».

La phase à 4°C des saumons « vieilli » et « ionisé » ne présente pas de développement de *L.monocytogenes*, contrairement au saumon « frais » où une légère croissance, plus faible que la première phase à 8°C, est observée. Effectivement cette croissance n'est observée qu'entre trois points de mesure, mais elle se répète pour les deux souches, ainsi que pour les trois inoculum. Il semblerait donc bien qu'une faible croissance du pathogène a lieu sur le saumon « frais » pendant la phase à 4°C. Ce résultat se retrouvent dans un expérimentation réalisées sur du saumon fumé conditionné sous vide, où un développement de *L.monocytogenes* fut observé à 4°C et d'autant plus que la qualité hygiénique



du poisson est bonne. (Rorvik et al., 1991) De plus, des études sur différents poissons, dont le saumon, indiquent que *L.monocytogenes* peut se multiplier durant un stockage à 5°C. (Jemmi, 1993) Or cette croissance n'est pas visible pour le saumon « ionisé » et la seule différence entre ces deux matrices est la présence d'une flore naturelle dans le saumon « frais ». Le développement de *L.monocytogenes* dans le saumon « frais » à 4°C est donc la conséquence de la présence d'une flore naturelle qui favoriserait le développement de *L.monocytogenes*. De plus aucune croissance n'est observable dans le saumon « vieilli » durant cette phase à 4°C. Il est donc nécessaire que la flore naturelle du saumon soit à la fois présente et en faible proportion pour que le pathogène se développe. Il est alors possible de faire l'hypothèse d'un phénomène, où la nature de la flore naturelle favoriserait le développement de *L.monocytogenes*. Il s'agirait peut être, de microorganismes dont la faible quantité ne puisse pas concurrencer *L.monocytogenes* et dont la présence favoriserait la croissance de ce pathogène. Si cette hypothèse est correcte, ces microorganismes devraient être relativement psychrotrophes et halophiles (comme *L.monocytogenes* à 4°C dans un produit salé) pour pouvoir se développer, et par conséquent favoriser le développement du pathogène. Par exemple, ces microorganismes pourraient produire des métabolites secondaires extracellulaires, qui seraient des facteurs de croissance pour *L.monocytogenes*. Néanmoins, aucune étude ne fait référence à un tel phénomène dans du saumon salé.

Les cinétiques de croissance du passage à 20°C donnent des résultats de temps de génération très variables, ce qui rend l'interprétation très délicate. Néanmoins, cette variabilité de résultat entre les souches, les matrices et les inoculum, peut nous amener à faire l'hypothèse d'un stress, initié par le passage à 20°C, qui engendrerait le bouleversement des cinétiques de croissances.

Beaucoup plus que la conservation en production et durant le transport du saumon salé, (phase à 4°C) les moyens de conservation en distribution et chez le particulier (première et seconde phase à 8°C) apparaissent des points à risques en ce qui concerne le développement de *L.monocytogenes* dans le saumon salé. Cette conclusion appuie celle d'une étude sur du saumon fumé conditionné sous vide, qui impute un fort développement du pathogène aux périodes de stockage à 4°C ou 10°C. (Guyer and Jemmi, 1991) Il semblerait donc urgent que des améliorations, soient mises en place en ce qui concerne les températures de stockage, principalement dans le domaine des linéaires de distribution et le domaine des réfrigérateurs ménagé. (environ 8°C actuellement) Néanmoins, les températures de fabrication de l'industriel et de transport du produit pourraient être revues à la baisse, car nous avons vu que *L.monocytogenes* peut se développer, à 4°C dans du saumon salé « frais ». Mais, industriellement, la diminution des températures n'est, bien sûr pas la panacée. Effectivement une étude démontre que les points critiques pour la maîtrise de la préparation du saumon, sont le filetage, le salage et le parage. (Rorvik et al., 1995) Par conséquent, une bonne pratique de l'hygiène et un respect des températures de stockage sont des points essentiels et indissociables pour diminuer les risques de contamination et de multiplication.



Pour les inoculations les plus faibles, (10UFC.g^{-1}) la concentration maximale tolérée de *L.monocytogenes* (100UFC.g^{-1}), est dépassée à environ 110h et 180h après inoculation pour le saumon salé « frais » et « ionisé ». (Graphique 5) Ces deux points correspondent à la première phase à 8°C , c'est à dire au moment de la conservation en linéaire de distribution. Les 10UFC.g^{-1} représentent la dose moyenne de contamination et les saumons « frais » et « ionisé » sont les produits les plus susceptibles d'être commercialisés. (l'irradiation à 10kGy n'est pas autorisée dans l'agroalimentaire, mais les valeurs utilisées d'environ 2kGy permettent aussi de détruire tous les microorganismes pathogènes) Par conséquent, lors d'une contamination pendant la production, les moyens mis en œuvre pour la conservation du saumon salé sous vide, entre la fabrication et l'utilisation, ne garantissent pas aux consommateurs, un maintien de *L.monocytogenes* en dessous de la norme en vigueur. Le saumon salé représente donc un risque de santé publique et particulièrement en ce qui concerne *L.monocytogenes*

Les trois études sur le saumon cru, fumé et salé à l'aneth, peuvent nous apporter des informations étayant les hypothèses avancées suite à l'étude du saumon salé.

L'hypothèse de la présence d'un effet de compétition peut se retrouver dans ces études. L'effet Jameson est de nouveau présent sur les matrices « fraîches » des saumons cru, (Annexe 11) fumé (Annexe 12) et salé à l'aneth, (Annexe 13) ce qui indique bien qu'une étroite relation existe entre la croissance de la flore naturelle du saumon et celle de *L.monocytogenes*. De plus, il est encore une fois observable que pour les matrices pourvus d'une flore naturelle (saumon « frais » et « vieilli ») des écarts apparaissent au cours du temps entre les deux souches d'un même inoculum. Par exemple cette forte interaction entre *L.monocytogenes* et la flore naturelle en fin de croissance peut se remarquer sur le saumon cru « frais » (Annexe 11), le saumon fumé « frais » ou « vieilli » (Annexe 12) et le saumon salé à l'aneth « frais » ou « vieilli ». (Annexe 13) Néanmoins, une exception apparaît pour la préparation salée à l'aneth, où le saumon « ionisé » est la seule matrice exempte de flore annexe sur laquelle des écarts significatifs entre souche d'un même inoculum apparaissent après le passage à 20°C . L'unique différence avec les autres types de saumon étudiés est la présence d'aneth et de sucre, car il y a du sucre dans la préparation du saumon salé à l'aneth. Il apparaîtrait donc que la synergie entre le passage à 20°C et l'aneth et/ou le sucre, engendrerait des troubles de croissance sur les souche de *L.monocytogenes* étudiées. Revenons à l'hypothèse de la compétition. Celle-ci est vérifiée une nouvelle fois car pendant la phase à 8°C et pour le saumon cru et le saumon fumé, la croissance de *L.monocytogenes* est toujours importante sur le saumon « ionisé », plus faible sur le saumon « frais » et quasi inexistante sur le saumon « vieilli ». Ce dernier résultat peut se vérifier graphiquement car les cinétiques de croissance sur cette matrice « vieilli » ont toutes une allure de droite horizontale durant les 28j des études (Annexe 11 : Cinétiques de croissances de *L.monocytogenes* (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C , 8°C et 20°C) des inoculations à 10 ; 100 et



1000UFC.g-1 sur le saumon cru. Annexe 11, Annexe 12 et Annexe 13) Ceci montre une nouvelle fois le potentiel inhibiteur d'une quantité importante de flore naturelle.

Là encore le saumon salé à l'aneth fait exception, car durant la première phase à 8°C, seul le saumon « frais » permet la croissance de *L.monocytogenes*. Il semblerait donc qu'une autre chose que la flore naturelle inhiberait la croissance du pathogène sur le saumon salé à l'aneth « ionisé ». Or nous avons observé une croissance sur le saumon salé « ionisé ». Par conséquent, c'est l'aneth et/ou le sucre qui auraient un effet inhibiteur sur la bactérie. Néanmoins, nous ne pouvons continuer l'analyse plus loin car aucune test de croissance n'a encore été réalisé sur du saumon uniquement salé et sucré.

Si nous souhaitons comparer, le potentiel de croissance de *L.monocytogenes* dans les quatre matrices étudiées sans tenir compte de la flore totale, il faut se référer d'une part à la matrice ionisée pour faire abstraction de la flore naturelle et d'autre part à la première phase à 8°C qui présentent des valeurs de taux de croissance comparables, c'est à dire n'indiquant pas une croissance nulle ou très faible. (Figure 8 et Annexe 10) Pour ce couple matrice « ionisée »/première phase à 8°C, il est remarquable que les taux de croissance du saumon fumé (de 13,7 à 19,6h) sont comparables à ceux du saumon salé. Or le saumon fumé a en fait été salé puis fumé. Par conséquent, le procédé de fumage, suivant le salage, ne semble pas avoir par rapport au sel de conséquences supplémentaires sur le développement de *L.monocytogenes* contaminant, après sa préparation, le saumon « ionisé ». Dans ces mêmes conditions, les temps de génération du saumon cru (allant de 20,8 à 52,6h) sont supérieurs à ceux des saumons « salés » et « fumés » et indiquent par conséquent que le développement du pathogène est plus fort dans le saumon « salé » et le saumon « fumé » que dans le saumon « cru ». Ceci signifierait donc qu'après fabrication le salage et le fumage ont un effet positif sur la croissance de *L.monocytogenes* dans le saumon ionisé. Pour la matrice « salé à l'aneth » les taux de croissance de la première phase à 8°C de la matrice « ionisée » indiquent une croissance inexistante (tg=0 ou tg très fort allant de 64,4 à 160,7h) L'effet inhibiteur de l'aneth et/ou du sucre est donc encore une fois envisageable.

Si de la même façon, nous comparons entre elles les préparations de saumon en tenant compte, cette fois si, de la flore naturelle, il faut nous référer aux taux de croissance de la matrice « fraîche » pendant la première phase de température à 8°C. (Figure 8 et Annexe 10) Ainsi, il est remarquable que ces dernières sont relativement proches. (tg de 23,5 à 49,8h pour le saumon cru ; de 20,7 à 46,4h pour le fumé ; de 19,3 à 35,1h pour le salé à l'aneth et de 18,8 à 26,0h pour le salé) Contrairement à ce que nous avons observé entre les matrices « ionisées », cette absence de différences entre les matrices « fraîches » serait la cause de la présence de la flore naturelle, dont les effets sur la croissance de *L.monocytogenes* seraient plus importants que les effets de la matrice seule. Effectivement, pour les saumons cru, fumé et salé, la présence d'une flore totale indiquerait une stagnation ou une augmentation de l'effet inhibiteur sur le pathogène car les taux de croissance des saumons « frais » (tg de 23,5 à 49,8h pour le saumon cru ; de 20,7 à 46,4h pour le fumé et de 18,8 à 26,0h pour le salé) sont



proches ou supérieurs à ceux des saumons « ionisés » (tg de 20,8 à 52,6h pour le saumon cru ; de 13,7 à 19,6h pour le fumé et de 13,3 à 18,4h pour le salé) durant le premier passage à 8°C. Mais pour le saumon salé à l'aneth, la présence d'une flore totale semble provoquer une augmentation de la croissance de *L.monocytogenes* car les taux de croissance observés pendant la première phase à 8°C sur le saumon « frais » (tg de 19,3 à 35,1h pour le salé à l'aneth) indiquent une croissance contrairement au saumon « ionisé ». (tg=0h ou très importants de 64,4 à 160,7h) Il semble donc que l'aneth et/ou le sucre ont un effet inhibiteur sur *L.monocytogenes* en absence de flore annexe, alors qu'en présence d'une flore annexe relativement faible (flore naturelle du saumon et de l'aneth) cet effet devient protecteur vis à vis de la croissance du pathogène.

Quant à la phase à 4°C, aucune croissance n'est détectable pour les saumons cru, fumé et salé à l'aneth quelque soit la matrice, la souche de *L.monocytogenes* et l'inoculation initiale. Ces résultats sont opposés à ceux observés sur la matrice « fraîche » du saumon salé. Il est donc avéré que le sel, comme unique adjuvant de la préparation du saumon, conditionne un développement de *L.monocytogenes* à 4°C sur une matrice peut contaminée par sa flore naturelle.

Tout comme le saumon salé, les saumons cru, fumé et salé à l'aneth représentent un risque de santé publique vis à vis de *L.monocytogenes*. Effectivement, les cinétiques de croissance à 10UFC.g⁻¹ dépassent le seuil de tolérance de 100UFC.g⁻¹ avant l'utilisation par le consommateur des matrices « fraîches » et « ionisées » des saumons cru, (Annexe 11) fumé (Annexe 12) et salé à l'aneth. (Annexe 13) De plus, tout comme le saumon salé, les phases de conservation en linéaire de distribution et chez le particulier se révèlent être les plus propices au développement de *L.monocytogenes* dans les saumons cru, fumé et salé à l'aneth.

VI/ Perspectives et conclusion générale :

Nous avons observé que la flore naturelle conditionnerait la croissance de *L.monocytogenes*. Pour étudier plus précisément ce phénomène de compétition, il serait intéressant de suivre le développement de la flore totale des échantillons inoculés par *L.monocytogenes*, et non pas, comme il a été fait dans ces tests de croissance, suivre la flore totale d'échantillons non contaminés. Ainsi, il serait possible de visualiser directement les phénomènes de compétition.

D'autre part pour comparer les tests de croissance réalisés sur les trois types de saumon, des essais d'analyses factorielles ont été réalisés sur l'ensemble des taux de croissance calculés. Mais cela n'a pas donné de résultats utilisables. En effet la quantité d'information est trop importante pour obtenir des graphiques lisibles. De ce fait, des analyses factorielles des taux de croissances pourrait être essayées avec les quantités d'information plus restreintes, c'est à dire sur des fractions restreintes de l'ensemble des études. Néanmoins, sans se référer aux courbes de croissances correspondantes, il est difficile d'attribuer des valeurs de temps de génération à des phases stationnaires ou de latence. En effet, il faudrait savoir à partir de quelle valeur de temps de génération, il est possible de considérer la



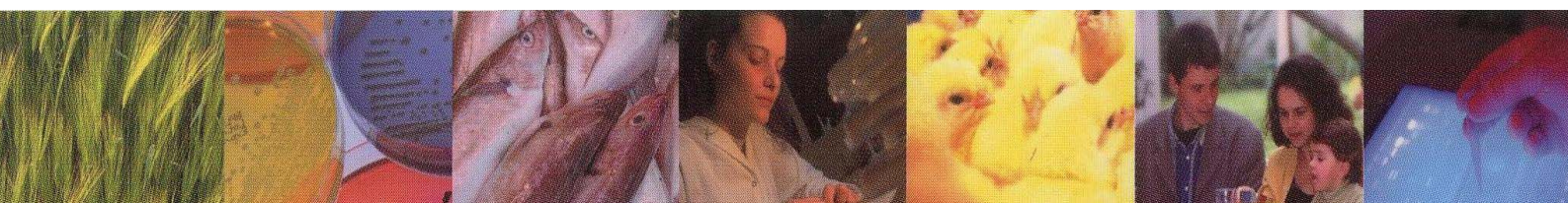
croissance comme nulle. Si ce développement est nulle, cela signifie que la cinétique de croissance admet, sur un intervalle de temps, (axe des abscisses) une asymptote horizontale. (tangente à la courbe de croissance) Dans une telle situation, la pente permettant de calculer le temps de génération, est théoriquement égale à 0. Ceci est impossible dans notre cas, car travailler sur du vivant n'est pas une science exacte. Effectivement, la régression linéaire sur des points, issus d'une phase stationnaire ou de latence, donnera un coefficient directeur proche de 0, mais vraisemblablement jamais égal à 0, car atteindre un coefficient de régression égal à 100% est quasi impossible. Dans la pratique, ces pentes sont négatives ou positives tout en étant proches de 0. Ce qui se répercute sur le calcul des temps de générations qui donne des valeurs négatifs ou des valeurs tendent vers l'infini. Ceci pose problème en analyse factorielle, car une même information (temps de génération nul) ne peut être représentée par deux grandeurs distinctes, (valeur nulle ou très importante) d'où l'utilité de fixer une valeur de pente, et donc une valeur de temps de génération, pour caractériser les phases stationnaires et les phases de latences.

Les résultats encourageants enregistrés lors des testes de croissance du saumon salé à l'aneth, nous indiquent un pouvoir inhibiteur de l'aneth et/ou du sucre sur *L.monocytogenes*. Pour distinguer le rôle exacte de ces deux composés vis à vis de la croissance du pathogène, les prochains tests de croissances sont programmés et seront réalisés sur du saumon salé sucré.

A long terme, les informations de ces tests de croissances pourront être utilisées dans le cadre de la microbiologie prévisionnelle. Cette science relativement récente, est un nouvel outil de prévision. Basé sur des modèles dynamiques et statistiques, la microbiologie prévisionnelle s'avère être d'une utilité précieuse pour la sécurité alimentaire. (McMeekin et al., 1997) En effet la modélisation du devenir de pathogènes dans des matrices alimentaires permet de prévoir d'éventuelles risques d'épidémies en tenant compte de l'utilisation et de la nature même du produit contaminé.

Sur le plan personnel, « agréable » est le qualificatif que j'utiliserais en premier pour parler de ce stage. L'entraide et les échanges de point de vue existant dans l'équipe de l'AFSSA de Boulogne sur mer, sont, je pense, des ingrédients tendant à mettre en place une atmosphère de travail agréable. Ce qui m'a plu, car allant de paire avec la productivité.

Professionnellement, l'étude de cinétiques de croissances, m'a appris à devenir autonome vis à vis des choix de dilutions successives, à mettre en œuvre pour dénombrer correctement les essais. Effectivement, le point crucial, est de prendre en compte, que le microorganisme peut aussi bien augmenter ou diminuer rapidement en nombre. De plus, ce stage technicien, m'a donné l'occasion, de découvrir sur le terrain les manipulations sous accréditation du COFRAC et de maîtriser l'utilisation de l'ensemencement spiral, ainsi que le maniement du logiciel « EndNote », qui s'est avéré d'un aide précieux pour la hiérarchisation des références bibliographiques.



D'autre part, après un premier stage technicien en laboratoire de Recherche en Physico-chimie et Biotechnologie, ce second, conforte l'objectif de mon projet professionnel, qui est de travailler en Microbiologie ou Physico-chimie alimentaire.

C'est pour toutes ces raisons, que je tiens, une nouvelle fois, à remercier l'équipe de l'AFSSA de Boulogne sur mer, pour leur accueil, et leur pédagogie.



Références bibliographiques

- Allerberger, F. (2003) *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 183-189.
- Berche, P. (1999) Physiopathologie et diagnostic bactériologique des infections materno-infantiles à *Listeria monocytogenes*. *Médecine thérapeutique/ Pédiatrie* **2**: 33-39.
- Budu-Amoako, E., Ablett, R.F., Harris, J., and Delves-Broughton, J. (1998) Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *L. monocytogenes* in cold-pack lobster meat. *Journal of food protection* **62**.
- Cortesi, M.L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N., and Pepe, T. (1997) Distribution and behavior of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally-contaminated vacuum-packed smoked salmon stored at 2 and 10 degrees C. *Int J Food Microbiol* **37**: 209-214.
- Croizé, J. (2000) Listériose: un problème de santé ancien ou actuel? *Rev Med Interne* **21**: 143-146.
- Directive-Européenne (1995) 95/2CE du 20 février. In.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E., and Pelroy, G. (1995) Incidence and source of *Listeria monocytogenes* un cold-smoked fishery products and processing plants. *J Food Prot* **58**: 502 - 508.
- Farber, J.M. (1993) Current research on *Listeria monocytogenes* in foods: an overview. *J Food Prot* **56**: 640-643.
- Garland, C.D. (1995) Microbiological quality of aquaculture products with special reference to *Listeria monocytogenes* in Atlantic salmon. *Food Australia* **47**: 559-563.
- Gonzalez-Rodriguez, M.N., Sanz, J.J., Santos, J.A., Otero, A., and Garcia-Lopez, M.L. (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int J Food Microbiol* **77**: 161-168.
- Guyer, S., and Jemmi, T. (1991) Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1523-1527.
- Hirsch, M. (2001) Avis de l'AFSSA relatifs à la classification des aliments selon le danger représenté par *Listeria monocytogenes*. In.
- Hof, H. (2003) History and epidemiology of listeriosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 199-202.



- Institut-de-veille-sanitaire (2004) Infections invasives à *H. influenzae*, *L. monocytogenes*, *N. meningitidis*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* et *S. pyogenes* en France en 2001-2002. In *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. France.
- Jemmi, T. (1993) *Listeria monocytogenes* in smoked fish: an overview. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* **44**: 10 - 13.
- Larpent, J.P. (2000) *Listéria*. Clermont-Rerrand.
- Legrand, G., and Adrian, J. (1981) *Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition*: Technique et Documentation.
- Ludorff, W., and Meyer, V. (1973) *Fische und Fischerzeugnisse*. Berlin.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S. et al. (1997) Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerg Infect Dis* **3**: 541-549.
- Rorvik, L.M., Yndestad, M., and Skjerve, E. (1991) Growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, smoked salmon, during storage at 4 degrees C. *Int J Food Microbiol* **14**: 111-117.
- Rorvik, L.M., Caugant, D.A., and Yndestad, M. (1995) Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in a salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. *Int J Food Microbiol* **25**: 19-27.
- Ross, T., Dalgaard, P., and Tienungoon, S. (2000) Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *Int J Food Microbiol* **62**: 231-245.
- Williams, and Wikins (1994) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. USA.



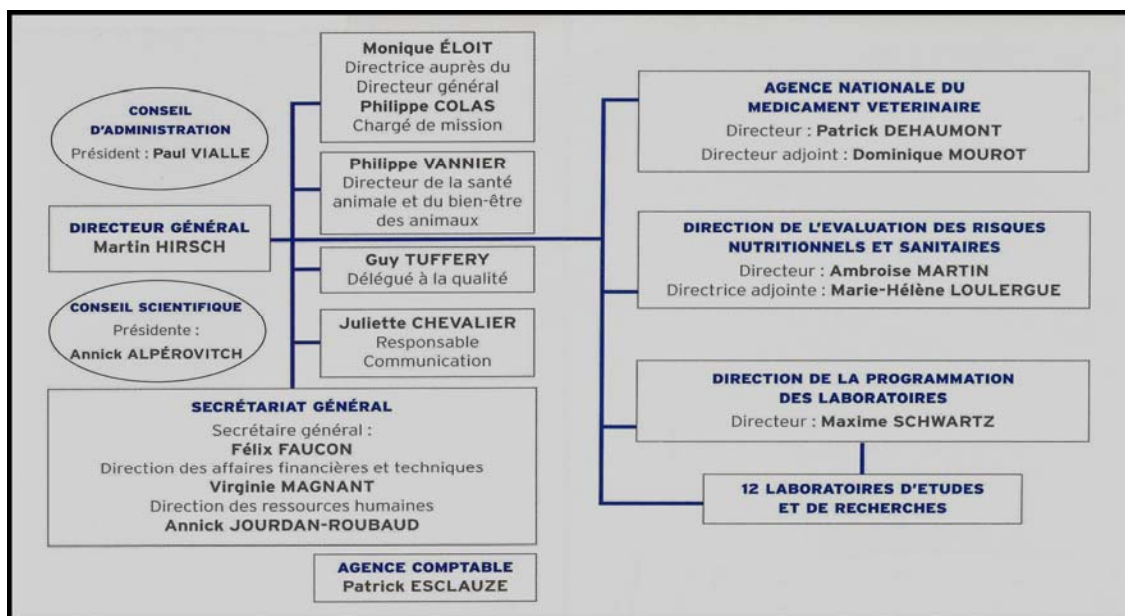
Sommaire des annexes

Annexe 1 : Diagramme de l'organisation générale de l'AFSSA.....	42
Annexe 2 : Les dix comités d'experts de L'AFSSA	42
Annexe 3 : Localisation des sites de l'AFSSA.....	43
Annexe 4 : Caractéristiques biochimiques communes au genre <i>Listeria</i> et différentielles des bactéries en bâtonnets réguliers, non sporulantes.....	44
Annexe 5 : Caractéristiques des différentes espèces de <i>Listéria</i>	45
Annexe 6 : Epidémiologies de Listérioses	46
Annexe 7 : Arbre de décision permettant de classer les aliments selon le danger <i>Listeria monocytogenes</i> au stade « achat » et au stade « consommation ».....	47
Annexe 8 : Protocoles de réalisation des tests de phase 1 et 2 selon l'avis de l'AFSSA relatif au classement d'un aliment face au danger <i>Listeria monocytogenes</i>	48
Annexe 9 : Exemple d'inoculation de matrice à 1000 UFC/g.....	49
Annexe 10 : Tableau récapitulatif des calculs de temps de génération tg (h) pour l'étude du saumon cru (a), fumé (b) et salé à l'aneth (c).....	50
Annexe 11 : Cinétiques de croissances de <i>L.monocytogenes</i> (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g ⁻¹ sur le saumon cru.....	51
Annexe 12 : Cinétiques de croissances de <i>L.monocytogenes</i> (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g ⁻¹ sur le saumon fumé.....	52
Annexe 13 : Cinétiques de croissances de <i>L.monocytogenes</i> (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g ⁻¹ sur le saumon salé à l'aneth.....	53
Annexe 14 : Composition en eau et lipide de quelques poissons.....	54
Annexe 15 : Teneurs en sodium de quelques poissons	54



Annexes

Annexe 1 : Diagramme de l'organisation générale de l'AFSSA



Remarque : Mr Hirsch a quitté ses fonctions le 01/04/05.

Annexe 2 : Les dix comités d'experts de L'AFSSA

Additifs, arômes et auxiliaires technologiques Présidente : Dominique PARENT-MASSIN	Matériaux au contact des denrées alimentaires Président : Alexandre FEIGENBAUM
Alimentation animale Président : Yves SOYEUX	Microbiologie Présidente : Christine VERNZOY-ROZAND
Biotechnologie Président : Maxime SCHWARTZ	Nutrition humaine Président : Dominique TURCQ
Eaux Président : Gilbert ALCAYDÉ	Résidus et contaminants chimiques et physiques Président : François ANDRÉ
Encéphalopathies spongiformes subaiguës transmissibles Président : Marc ÉLOIT	Santé animale Président : Philippe DORCHIES



Annexe 3 : Localisation des sites de l'AFSSA

<p>Site de Maisons-Alfort Laboratoire d'études et de recherches en pathologie animale et zoonoses 22, rue Pierre Curie - BP 67 94703 MAISONS-ALFORT cedex Directeur : Eric PLATEAU Tél. : 01 49 77 13 00 Fax : 01 49 77 26 93</p>	<p>Site de Fougères Laboratoire d'études et de recherches sur les médicaments vétérinaires et les désinfectants La Haute Marche - Javené 35133 FOUGÈRES Directeur : Pascal SANDERS Tél. : 02 99 94 78 78 Fax : 02 99 94 78 99</p>
<p>Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments 10, rue Pierre Curie 94700 MAISONS-ALFORT cedex Directrice : Françoise JANIN Tél. : 01 49 77 13 00 Fax : 01 49 77 26 95</p>	<p>Agence nationale du médicament vétérinaire La Haute Marche - Javené 35133 FOUGÈRES Directeur : Jacques BOISSEAU Tél. : 02 99 94 78 72 Fax : 02 99 94 78 99</p>
<p>Laboratoire d'études et de recherches sur l'alimentation collective 22, rue Pierre Curie - BP 332 94709 MAISONS-ALFORT cedex Directeur : Gérard POUMEYROL Tél. : 01 49 77 26 50 Fax : 01 49 77 26 40</p>	<p>Site de Nancy Laboratoire d'études et de recherches sur la rage et la pathologie des animaux sauvages Directrice : Florence CLIQUET Laboratoire d'études et de recherches en hydrologie Directeur : Jean François MUNOZ Domaine de Pixérécourt - BP 9 54220 MALZÉVILLE Tél. : 03 83 29 89 50 Fax : 03 83 29 89 59</p>
<p>Site de Boulogne Laboratoire d'études et de recherches sur les produits de la pêche Gare de Marée - Rue Huret-Lagache 62200 BOULOGNE/MER Directeur : Pierre MALLE Tél. : 03 21 99 25 00 Fax : 03 21 30 95 47</p>	<p>Site de Niort Laboratoire d'études et de recherches caprines 60, rue du Pied-de-Fond - BP 3081 79012 NIORT cedex Directeur : Gérard PERRIN Tél. : 05 49 79 61 28 Fax : 05 49 79 42 19</p>
<p>Site de Brest Laboratoire d'études et de recherches en pathologie des poissons BP 70 - 29280 PLOUZANÉ Directrice : Martine VIGNEULLE Tél. : 02 98 22 44 62 Fax : 02 98 05 51 65</p>	<p>Site de Ploufragan Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines BP 53 - 22440 PLOUFRAGAN Directeur : Philippe VANNIER Tél. : 02 96 01 62 50 Fax : 02 96 01 62 53</p>
<p>Site de Dozulé Laboratoire d'études et de recherches en pathologie équine Goustranville - 14430 DOZULÉ Directrice : Claire COLLOBERT Tél. : 02 31 79 22 76 Fax : 02 31 39 21 37</p>	<p>Site de Sophia-Antipolis Laboratoire d'études et de recherches sur les petits ruminants et les abeilles Les Templiers - 105, Route des Chappes BP 111 - 06902 SOPHIA ANTIPOLIS cedex Directeur : Michel PÉPIN Tél. : 04 92 94 37 00 Fax : 04 92 94 37 01</p>
<p>Site de Lyon Laboratoire d'études et de recherches en pathologie bovine et hygiène des viandes 31, avenue Tony Garnier - BP 7033 69342 LYON cedex 07 Directeur : Bruno ANDRAL Tél. : 04 78 72 65 43 Fax : 04 78 61 91 45</p>	



Annexe 4 : Caractéristiques biochimiques communes au genre *Listeria* et différentielles des bactéries en bâtonnets réguliers, non sporulantes

Réactions positives	Réactions négatives
Catalase	Oxydase
Glucose, fructose, mannose, amygdaline, salicine, cellobiose, maltose, tréhalose, arabitol	Gaz en glucose
VP RM (Lexique 5)	Uréase
Esculine	Indole
Type respiratoire : aeroanaérobies facultatifs	Gélatinase
Réduction du lait tournesolé	H ₂ S

(Larpent, 2000)

	Aeroanaérobies facultatifs Catalase -		Aeroanaérobies facultatifs Catalase +		Aérobies strictes	
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Brochothrix</i>	<i>Listéria</i>	<i>Kurthia</i>	<i>Caryophanon</i>
morphologie	Bâtonnets droits ou incurvés, voir coccobacilles	Bâtonnets fins, souvent en filament	Bâtonnets fins, souvent en filament	Bâtonnets courts, courtes chaînettes et filaments	Bâtonnets réguliers en chaînettes, cocci en vieilles cultures	Bâtonnets courts en chaînettes
Taille (µm)	0,5-1,6	0,2-0,5	0,6-0,8	0,4-0,5	0,7-0,9	1,4-3,2
Mobilité péritriche	-	-	-	+(20-25°C)	+	+
Croissance 35°C	+	+	-	+	+	+
H ₂ S	-	+	-	-	-	-

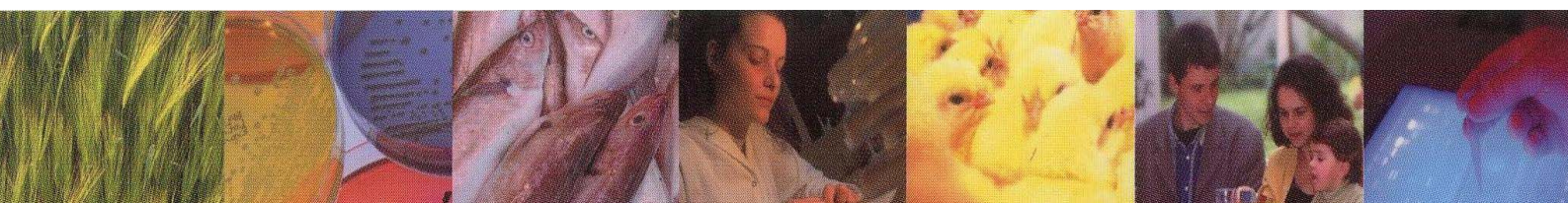
(Williams and Wikins, 1994)



Annexe 5 : Caractéristiques des différentes espèces de *Listéria*

	<i>L.monocytogenes</i>	<i>L.innocua</i>	<i>L.seeligeri</i>	<i>L.welshimeri</i>	<i>L.ivanovii</i>	<i>L.grayi</i>	<i>L.murrayi</i>
B hémolyse	+	-	+	-	+	-	-
Test CAMP (Lexique 6) <i>(Staphylococcus aureus)</i>	+	-	+	-	-	-	-
Test CAMP <i>(Rhodococcus equi)</i>	-	-	-	-	+	-	-
Production d'acide à partir de :							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	-	-	?	?	-	-	-
Dextrine	+/-	-	?	?	-	+	+
Galactose	+/-	-	?	?	+/-	+	+
Gluconate	-	-	-	-	-	+	+
Glycogène	-	-	?	-	-	-	-
lactose	+/-	+	+	?	+	+	+
D-lyxose	-	-	?	?	-	+	+
Mannitol	-	-	-	-	-	+	+
Hydrolyse de :							
Urée	-	-	-	-	-	-	-
Cellulose	-	-	?	?	-	-	-
Amidon	+/-	+/-	?	?	-	-	-

(Williams and Wikins, 1994)



Annexe 6 : Prévalence de Listérioses

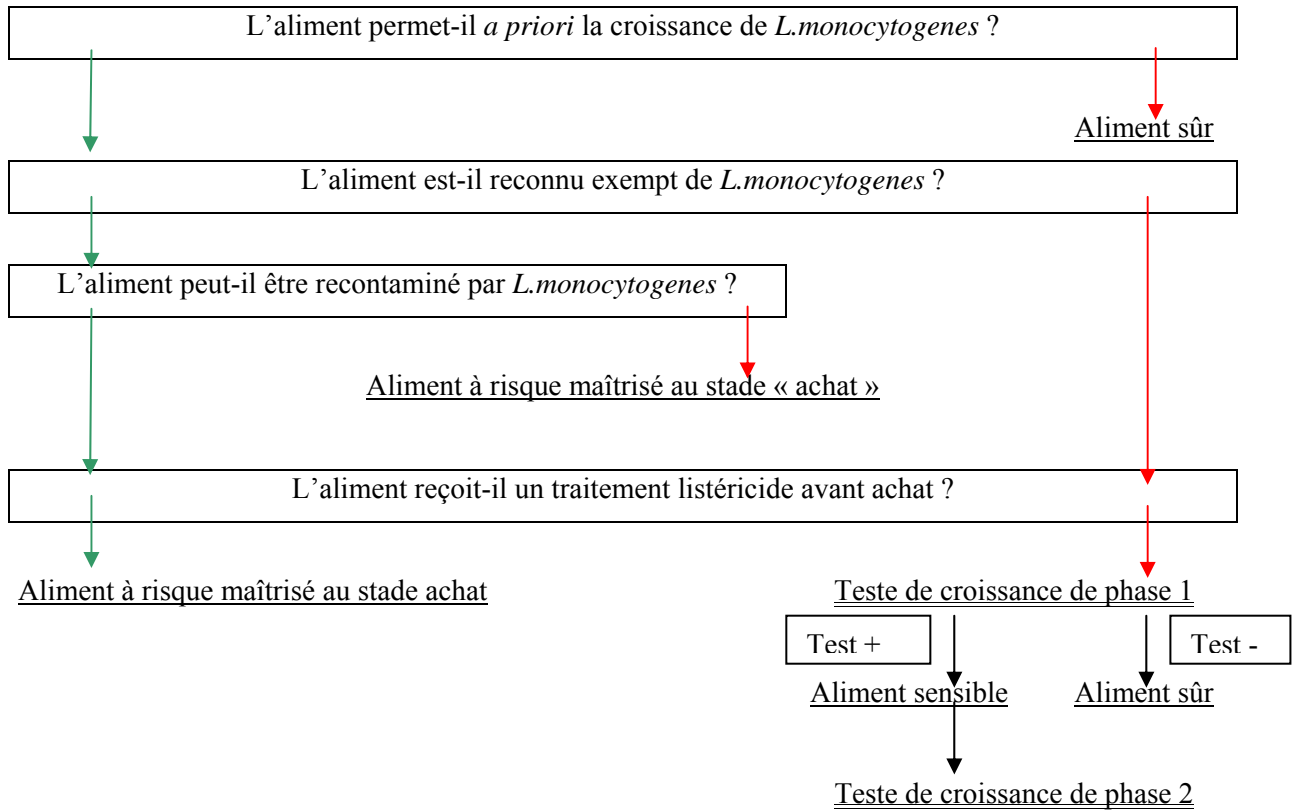
Localisation	Nombre de cas	Année(s)	Nombre de cas
Halle (Allemagne de l'Est)	100	1949-57	Lait cru lait acide, crème,
Iéna (Allemagne de l'Est)	26	1954	
Union soviétique	19	1956	Porc, souris
Brème (Allemagne de l'Est)	81	1960-61	
Halle (Allemagne de l'Est)	279	1966	
Auckland (Nlle-Zélande)	13	1969	
Anjou (France)	162	1975-76	
Johannesburg (Afrique du sud)	14	1977-78	
Australie	12	1978-79	Végétaux crus
Massachusetts (USA)	20	1979	Végétaux crus, lait
Auckland (Nlle-Zélande)	10	1979-1980	
Auckland (Nlle-Zélande)	22	1980	Poisson cru, crustacés
Angleterre	11	1981	Crème
Slovaquie	49	1981	
Canada	41	1981	Salade de chou
Christchurch (Nlle-Zélande)	18	1981-82	
Houston (USA)	10	1983	
Allemagne de l'Ouest	25	1983	
Massachusetts (USA)	49	1983	Lait pasteurisé
Vaud (Suisse)	122	1983	Vacherin Mont d'or
Los Angeles (USA)	142	1985	Fromage mexicain
Danemark	35	1985-1987	
Linz (Autriche)	20	1986	Lait cru, végétaux
Los Angeles (USA)	37	1986-87	Œuf liquide
Los Angeles (USA)	11	1987	Beurre
Angleterre	23	1987	
France	279	1992	Langue de porc en gelée
France	10	1993	Rillettes
Italie	18	1994	Salade de riz
Illinois (USA)	48	1994	Lait chocolaté
France	33	1995	Brie de Meaux
France	14	1997	Pont l'évêque

(Larpent, 2000)

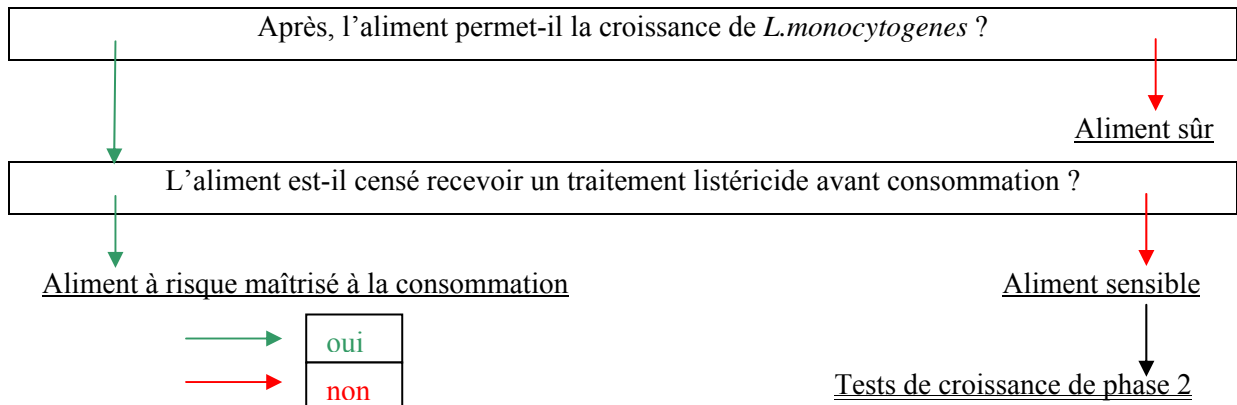


Annexe 7 : Arbre de décision permettant de classer les aliments selon le danger *Listeria monocytogenes* au stade « achat » et au stade « consommation »

Au stade « achat » :



Au stade consommation :



(Hirsch, 2001)



Annexe 8 : Protocoles de réalisation des tests de phase 1 et 2 selon l'avis de l'AFSSA relatif au classement d'un aliment face au danger *Listeria monocytogenes*

Test de phase 1

- Choix des souches

Deux souches seront utilisées :

- une souche de terrain, identifiée de façon adéquate (souche isolée de l'aliment ou, en l'absence d'une telle souche, la plus proche possible de celles potentiellement présentes dans le produit ou la gamme de produit de même nature),
 - la souche de référence du sérovar 4b, CIP⁵ 78.38.
- Les deux souches seront étudiées séparément.

- Préparation de l'inoculum

La culture préparatoire des souches s'effectuera à 30°C dans le milieu le plus approprié à leur multiplication, jusqu'à l'obtention de souches en phase post-exponentielle de croissance. L'inoculum devra permettre d'obtenir 1000 UFC/g de produit fini, avec une tolérance de \pm 500 UFC/g. Cette concentration, relativement élevée, permettra un dénombrement avec une précision suffisante.

- Inoculation de l'aliment

L'inoculation sera réalisée dans les conditions les plus proches des conditions naturelles de contamination, en modifiant le moins possible la structure, la composition, les propriétés physico-chimiques, le conditionnement de l'aliment, et en prenant garde à l'homogénéité de l'inoculum par rapport aux zones prélevées pour les analyses.

- Conditions de conservation de la denrée alimentaire inoculée

Les échantillons seront maintenus à 30°C (\pm 1°C) pendant toute la durée du test et à 15°C (\pm 1°C) si le test à 30°C est négatif.

- Durée d'incubation de l'aliment et nombre de points d'analyse

Les prélèvements seront réalisés à J0, J1, J2, J5 puis tous les 5 jours jusqu'à l'observation d'une croissance de *Listeria monocytogenes*, ou jusqu'à ce que les aliments présentent des altérations organoleptiques.

- Méthode

La méthode d'analyse sera une méthode normalisée (normes EN ISO 11290-2, AFNOR XPV08-062) permettant le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

- Procédé de fabrication

Le dossier comportera le descriptif détaillé du procédé de fabrication et mettra en exergue tous les points justifiant le choix des paramètres du protocole présenté (par exemple, une attention sera portée sur les étapes critiques du procédé où la contamination de l'aliment par *Listeria monocytogenes* est possible).

- Denrée alimentaire

Le dossier présentera :

- les caractéristiques physico-chimiques de la denrée alimentaire, sa structure, les facteurs *a priori* importants pour le comportement de *Listeria monocytogenes* et qu'il faudra prendre en compte dans le test (conditionnement par exemple) ;
- la nature des flores annexes habituellement rencontrées ;
- les habitudes raisonnablement prévisibles de distribution et de consommation.

- Historique de la contamination de la denrée alimentaire par *Listeria monocytogenes*

Ce point pourra être illustré par des données bibliographiques (cas groupés, données résultant de plans de surveillance ou de contrôle, de travaux scientifiques, d'organisations interprofessionnelles). Un bilan des autocontrôles de l'établissement ou de la filière devra être présenté.

- Choix des souches

Au moins 2 souches seront choisies dont :

- une souche de terrain, identifiée de façon adéquate (souche isolée de l'aliment ou, en l'absence d'une telle souche, la plus proche possible de celles potentiellement présentes dans le produit ou la gamme de produit de même nature),
 - la souche de référence du sérovar 4b, CIP⁶ 78.38.
- Les souches seront étudiées séparément.

- Préparation de l'inoculum

La préculture sera réalisée à une température la plus proche possible de la première température de conservation de l'aliment, tout en permettant la croissance en un temps raisonnable permettant la réalisation des essais (par exemple, pour les denrées réfrigérées à 4°C, ne pas dépasser 14°C pour la préculture). Les souches seront utilisées en phase post-exponentielle de croissance.

L'inoculum devra permettre d'obtenir 1000 UFC/g de produit fini, avec une tolérance de \pm 500 UFC/g. Cette concentration, relativement élevée permettra un dénombrement avec une précision suffisante.

- Inoculation de l'aliment

L'inoculation devra être réalisée en simulant le mieux possible les conditions naturelles de contamination. Si nécessaire, une répétition du test pourrait être envisagée, en ensemençant l'aliment à différentes étapes du procédé de fabrication. L'incidence des recontaminations éventuelles, après fabrication, devrait être appréciée.

L'inoculation sera réalisée en modifiant le moins possible la structure, la composition, les propriétés physico-chimiques, le conditionnement de l'aliment, et en prenant garde à l'homogénéité de l'inoculum par rapport aux zones prélevées pour les analyses.

- Conditions de conservation de la denrée alimentaire inoculée

Les conditions de conservation de l'aliment (temps/température) devront tenir compte des obligations réglementaires et des conditions raisonnablement prévisibles, selon les modes de distribution, de transport, de stockage, jusqu'à sa consommation finale.

La durée et la température de chaque étape de la vie de l'aliment (en prenant en compte des ruptures de la chaîne du froid, éventuellement multiples) devront être justifiées et choisies en envisageant les conditions réalistes les plus favorables à la croissance bactérienne.

- Nombre d'analyses par lot de produit

L'objectif est d'évaluer l'accroissement de la population de *Listeria monocytogenes* au cours de la conservation jusqu'au stade de la consommation.

Dans ces conditions, les analyses en début et en fin de conservation seront privilégiées et en outre on regardera plus particulièrement les points où la vitesse de croissance est susceptible d'être fortement modifiée (par exemple, étapes précédant et suivant la vente au consommateur).

Trois répétitions minimum par point d'analyse devront être réalisées.

- Nombre de lots

Le nombre de lots sera d'autant plus grand que les lots de fabrication présentent une hétérogénéité entre eux. Un minimum de 3 lots sera analysé.

- Méthode

La méthode d'analyse sera une méthode normalisée (normes EN ISO 11290-2, AFNOR XPV08-062) permettant le dénombrement de *Listeria monocytogenes*.

Test de phase 2



Annexe 9 : Exemple d'inoculation de matrice à 1000 UFC/g

Premièrement : détermination de la concentration de la suspension mère :

Une densité optique à 650 nm de 0,150 représente 3.10^8 UFC/g. Par conséquent une suspension mère diluée au 1/10 et donnant une $DO=0,188$ (**Lexique 13**) a une concentration $C_i=10 \times (0,188 \times 3.10^8) / 0,150 \approx 3,76.10^9$ UFC/g.

Deuxièmement : détermination de la quantité de bactéries à déposer sur la matrice :

Une concentration de 1000 UFC/g correspond, pour une matrice de 25g, à une quantité de bactérie $n=(1000 \times 25) / 1 = 25000$ UFC

Troisièmement : détermination de la concentration de la solution à déposer sur la matrice :

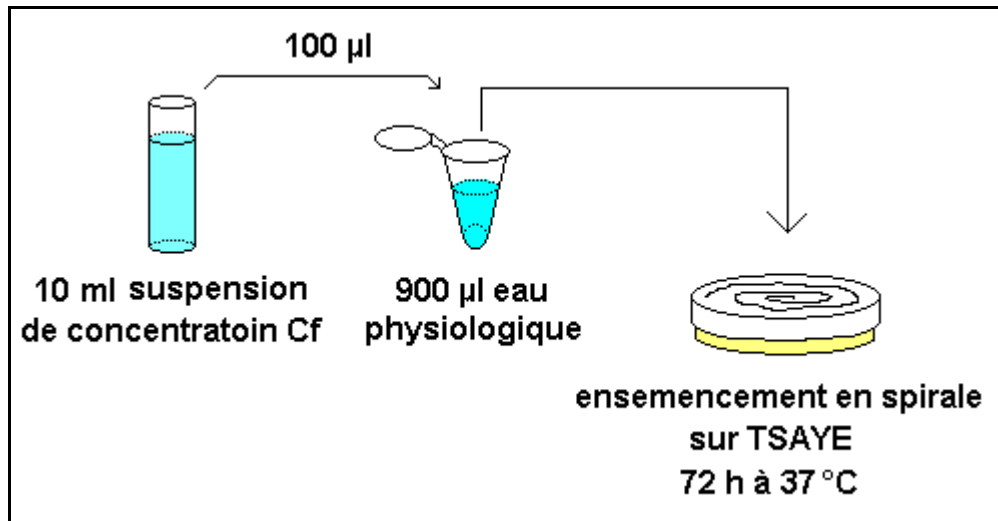
L'inoculation des matrices se fait sous un volume $v=50\mu\text{l}$. Par conséquent la concentration de la solution à déposer $C_f=n/v=25000/50.10^{-3}=5.10^5$ UFC/g.

Quatrièmement : Préparation de la solution à déposer à partir de la suspension mère :

Celle ci est préparée sous un volume $V_f=10$ ml. Ainsi il faut compléter à 10ml un volume de solution mère $V_i=C_f \times V_f / C_i = (5.10^5 \times 10) / 3,76.10^9 \approx 1,33\mu\text{l}$.

Il faut donc mettre $1,33\mu\text{l}$ de la suspension mère dans 10ml d'eau physiologique et déposer sur la matrice $50\mu\text{l}$ de cette solution pour obtenir une inoculation de 1000 UFC/g.

Remarque : Pour garantir le bon déroulement de l'inoculation la concentration C_f de la solution à déposer est vérifiée de la façon suivante :



(Composition de milieu 7)

Annexe 10 : Tableau récapitulatif des calculs de temps de génération tg (h) pour l'étude du saumon cru (a), fumé (b) et salé à l'aneth (c)

a

	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	105,3	328,5	41,7	380,0	-223,6
8°C	49,8	33,5	23,5	37,1	27,3	29,2	
20°C	2,9	3,4	-1,5	3,0	-1,9	-3,4	
8°C	61,0	66,7	68,5	43,6	37,4	31,9	
vieilli	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	-329,3	203967,1	562,5	-361,8	-220,2
8°C	212,0	-388,6	244,6	665,4	223,5	177,3	
20°C	-8,3	30,0	-14,3	-10,9	-23,1	-10,0	
8°C	300,5	262,5	309,5	963,7	145,3	559,5	
ionisé	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	145,4	240,9	232,3	184,9	1082,3
8°C	20,8	28,9	31,9	25,1	30,3	52,6	
20°C	2,9	1,3	1,7	4,9	17,2	0,9	
8°C	42,5	75,8	25,5	32,3	25,4	46,6	

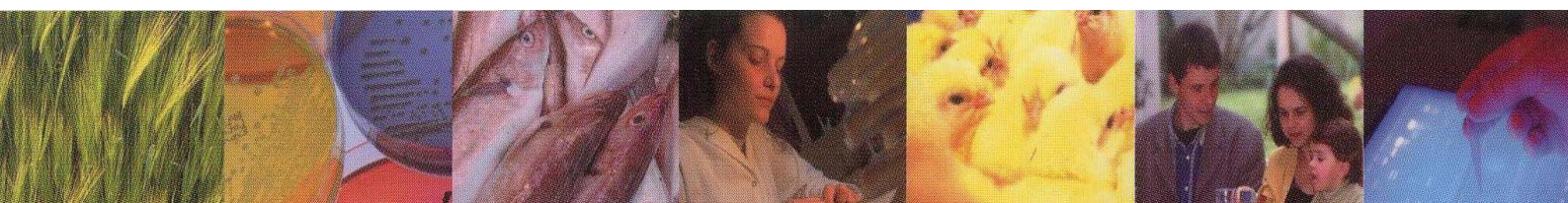
b

	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	52,8	135,0	50,7	73,9	102,7
8°C	29,5	24,5	20,7	21,6	46,4	34,3	
20°C	-2,0	18,0	27,4	13,6	3,1	2,0	
8°C	100,2	40,3	-191,7	177,5	85,4	89,8	
vieilli	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	-685,2	1599,9	-1744,8	22119,4	382,1
8°C	862,8	166,3	91,6	85,7	-546,3	69,0	
20°C	16,2	-5,0	-5,0	-6,1	-7,7	-5,3	
8°C	70,3	40,2	73,9	46,7	44,0	70,7	
ionisé	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	63,6	94,3	90,3	49,6	46,9
8°C	16,7	14,3	16,1	18,9	19,6	13,7	
20°C	1,7	1,8	2,7	-152,7	1,1	2,2	
8°C	90,3	36,3	61,8	27,0	37,3	34,4	

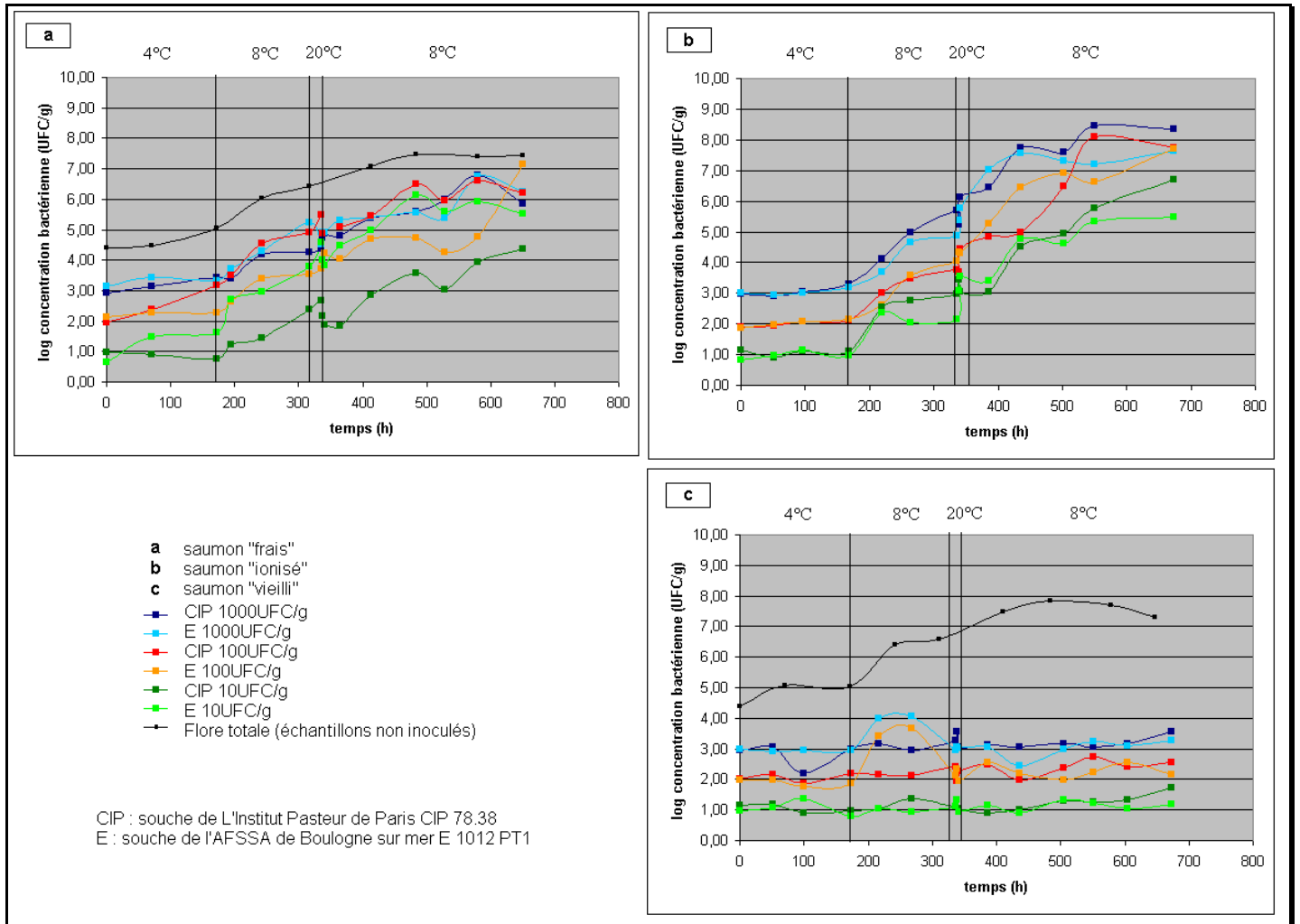
c

	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	66,3	58,8	225,1	39,5	60,0
8°C	19,3	22,9	28,1	35,1	23,8	29,3	
20°C	-2,1	1,7	-2,3	0,6	-1,2	3,6	
8°C	41,1	-151,1	21,5	327,5	21,0	53,3	
vieilli	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	139,6	3474,9	356,7	626,4	72,2
8°C	-330,0	50,9	46,0	254,1	133,6	122,0	
20°C	-301,2	-3,7	-0,9	4,4	5,2	2,7	
8°C	131,0	4898,6	457,1	-3279,2	271,6	-296,1	
ionisé	température	1000UFC/g		100UFC/g		10UFC/g	
		CIP	E	CIP	E	CIP	E
		4°C	147,4	-394,1	436,0	593,1	53,7
8°C	-11257,9	160,7	95,7	74,0	-56,5	64,4	
20°C	7,7	1,8	4,4	-2,6	0,7	2,5	
8°C	88,2	88,2	32,0	67,6	-164,8	-610,3	

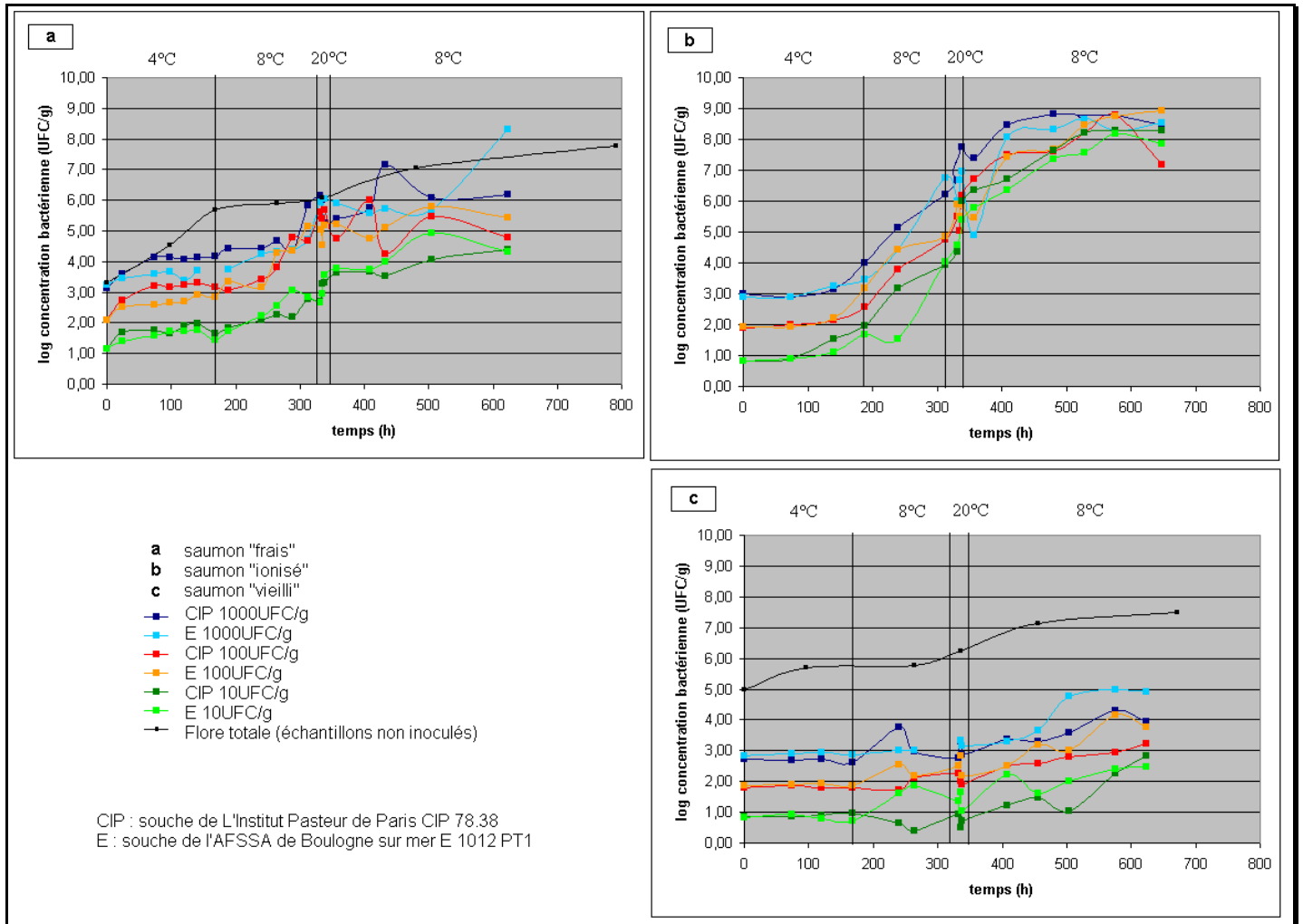
Remarque: Les chiffres négatifs (grisés) doivent être considérés comme nuls car ils sont issus du calcul d'une pente négative, représentant une vitesse de croissance qui elle ne peut être négative. Ceci s'explique car le calcul d'une pente sur une phase de latence ou une phase stationnaire donne un résultat proche de 0 et donc pouvant être négatif.



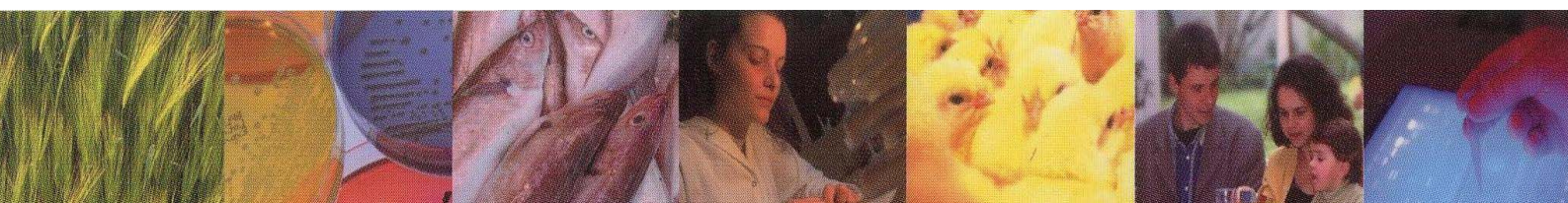
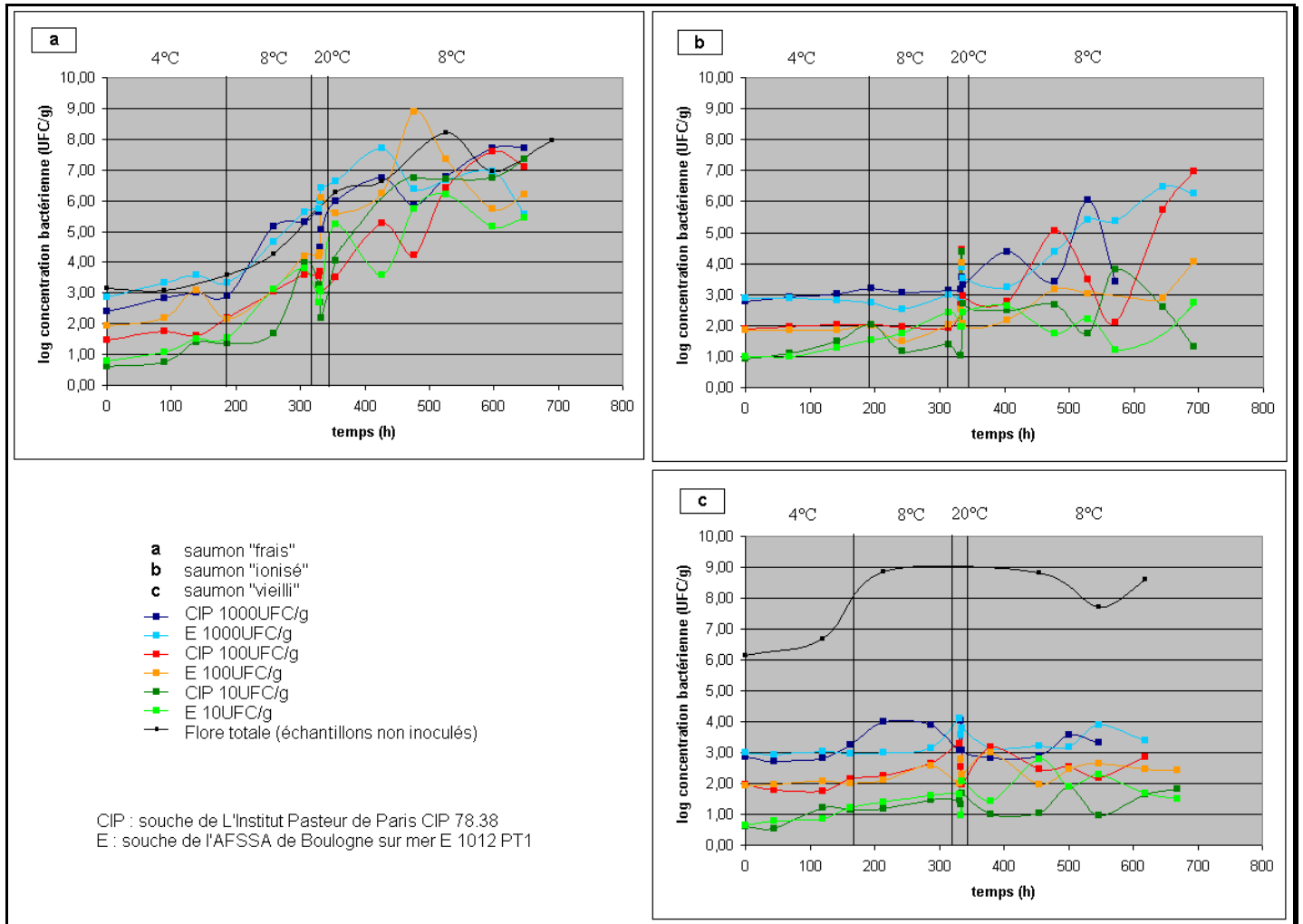
Annexe 11 : Cinétiques de croissances de *L.monocytogenes* (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g⁻¹ sur le saumon cru.



Annexe 12 : Cinétiques de croissances de *L.monocytogenes* (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g⁻¹ sur le saumon fumé.



Annexe 13 : Cinétiques de croissances de *L.monocytogenes* (souche E 1012 PT1 et souche CIP 78.38) à différent températures (4°C,8°C et 20°C) des inoculations à 10 ;100 et 1000UFC.g⁻¹ sur le saumon salé à l'aneth.



Annexe 14 : Composition en eau et lipide de quelques poissons

Espèces	en g pour 100g de chair (% massique)	
	Eau	Lipides
Eglefin	81	0,2
Hareng	69	11,5
Cabillaud	81	Très variable
Saumon	65	13,5
Albacore	66	7,5
Anguille	65	19
Maquereau	67	12
Sardine	71	8,5
Thon	71	3,5

(Legrand and Adrian, 1981)

Annexe 15 : Teneurs en sodium de quelques poissons

Espèces	Na en mg pour 100g de chaire
Hareng	118
Thon rouge	43
Saumon	51
Maquereau	144
Flétan	78
Loup	105
Eperlan	98
Turbot	114
Sole	100
Plie grise	121
Limande sole	80
Carrelet	104
Flet	92
Merlu	101
Lingue	107
Cabillaud	86
Eglefin	116

(Ludorff and Meyer, 1973)



Sommaire des compositions de milieu

Composition de milieu 1 : BCC Bouillon Cœur Cervele (11).....	56
Composition de milieu 2 : EPT Eau Peptonée Tamponnée (11).....	56
Composition de milieu 3 : Palcam	56
Composition de milieu 4 : Oxford.....	57
Composition de milieu 5 : Fraser	57
Composition de milieu 6 : PCA Plate Count Agar (11).....	58
Composition de milieu 7 : TSAYE Tryptic Soy Adar Yeast Extract (11).....	58



Composition de milieu

Les milieux suivant sont stérilisés 15 min à 121°C.

Composition de milieu 1 : BCC Bouillon Cœur Cervele (1l)

Extrait de cervelle de veau	12,5g
Peptone	10,0g
Extrait de cœur de bœuf	5,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Hydrogène orthophosphate disodique	2,5g
Glucose	2,0g
PH	7,4

Composition de milieu 2 : EPT Eau Peptonée Tamponnée (1l)

Peptone	10,0g
Chlorure de sodium	5,0g
Phosphate disodique anhydre	3,5g
Phosphate monopotassique	1,5g
pH	7,0

Composition de milieu 3 : Palcam

Gélose Palcam		Gélose Palcam de base (1 l)		Supplément Palcam	
Gélose Palcam de base	500ml	Peptone	23,0g	Ceftazidine	10,0mg
Supplément Palcam	1	Chlorure de litium	15,0g	Polymixine B	5,0mg
		Agar	10,0g	Acriflavine	2,5mg
		Mannitol	10,0g	Eau	2,5ml
		Chlorure de sodium	5,0g		
		Extrait de levure	3,0g		
		Amidon de maïs	1,0g		
		Esculine	0,8g		
		Citrate de fer amoniacal	0,5g		
		Glucose	0,5g		
		Rouge de phénol	0,08g		
		PH	7,2		



Composition de milieu 4 : Oxford

Gélose Oxford		Gélose Oxford de base (1 l)		Supplément Oxford	
Gélose Oxford de base	500ml	Peptone	23,0g	Cycloheximide	200mg
Supplément Oxford	1	Chlorure de lithium	15,0g	Colistine	10mg
		Agar	12,0g	Fosfomycine	5,0mg
		Chlorure de sodium	5,0g	Acriflavine	2,5mg
		Amidon	1,0g	Cefotetan	1,0mg
		Esculine	1,0g	Ethanol	2,5 ml
		Citrate de fer III ammoniacal	0,5	Eau	2,5 ml
		PH	7,0		

Composition de milieu 5 : Fraser

Fraser Complet		Bouillon Fraser (1 l)		Supplément Fraser	
Bouillon Fraser	500ml	Chlorure de sodium	20,0g	Acuflavine	12,5mg
Supplément Fraser	1	Hydrogenophosphate disodique	12,0g	Acide nalidixique	10,0mg
		Extrait de levure	5,0g	Citrate de fer ammoniacal	0,25g
1/2 Fraser		Extrait de viande de boeuf	5,0g	Ethanol	2,5 ml
Bouillon Fraser	500ml	Protéase peptone	5,0g	Eau	2,5 ml
Supplément Fraser	1/2	Tryptone	5,0g		
		Chlorure de lithium	3,0g		
		Dihydrogenophosphate de potassium	1,35g		
		Esculine	1,0g		
		pH	7,2		



Composition de milieu 6 : PCA Plate Count Agar (1l)

Agar	15,0g
Tryptone	5,0g
Extrait de levure	2,5g
Glucose	1,0g
pH	7,2

Composition de milieu 7 : TSAYE Tryptic Soy Adar Yeast Extract (1l)

Tryptone	15,0g
Agar	15,0g
Extrait de levure	6,0g
Peptone de soja	5,0g
Chlorure de soja	5,0g
pH	6,0

