



Rapport
de la Commission d'étude des risques
liés à *Listeria monocytogenes*

juillet 2000

COMPOSITION DE LA COMMISSION

Patrick BERCHE

Professeur de Virologie et de Bactériologie, Faculté de Médecine Necker Enfants Malades,
Praticien Hospitalier, Chef de Service, Paris.

Anne BRISABOIS

Chef de l'Unité d'Epidémiologie bactérienne,
Laboratoire d'études et de recherches sur l'hygiène et la qualité des aliments,
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort.

Michel CATTEAU

Direction des enseignements,
Institut Pasteur de Lille

Jean-Pierre FLANDROIS (Président)

Professeur de Virologie et de Bactériologie, UMR CNRS 55-58,
Praticien Hospitalier, Chef de Service, Oullins.

Jean-Claude LABADIE

Responsable unité de recherches en microbiologie,
Directeur adjoint de la station INRA de recherches sur la viande, Saint-Genès-Champanelle.

Jocelyne ROCOURT

Chef de laboratoire,
Centre National de Référence des *Listeria*,
Institut Pasteur, Paris.

Gilles SALVAT

Chef de l'unité hygiène et qualité des produits avicoles et porcins,
Laboratoire d'études et de recherches avicoles et porcines,
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Ploufragan.

Josée VAISSAIRE

Responsable Secteur Bactériologie Spéciale,
Unité de zoonoses bactériennes,
Laboratoires d'études et de recherches en pathologie animale et zoonose,
Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Maisons-Alfort.

Véronique VAILLANT

Médecin Epidémiologiste,
Institut de Veille Sanitaire, Saint-Maurice.

Dominique VIDON

Professeur à l'université Louis Pasteur,
Faculté de Pharmacie, Illkirch.

Robert VRANCKX

Département de Microbiologie,
Institut de santé publique, Bruxelles.

TABLE DES MATIÈRES

COMPOSITION DE LA COMMISSION	1
TABLE DES MATIÈRES	2
INTRODUCTION AU RAPPORT, par Jean-Pierre Flandrois, Président de la Commission	7
SECTION A : PHYSIOLOGIE DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	11
Question n°1 : Quels sont les caractères bactériologiques de <i>L. monocytogenes</i> ?	11
Question n°2 : Que sait-on des conditions de développement de <i>L. monocytogenes</i> ?	12
• Que sait-on des besoins pour la croissance, des milieux favorables et de l'environnement ?	12
• Que sait-on des besoins en fer et l'effet de la carence ?	12
Question n°3 : Que sait-on de l'influence de la température sur la croissance de <i>L. monocytogenes</i> ?	12
Question n°4 : Que sait-on de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> selon le pH, l'activité de l'eau et la teneur en NaCl ?	14
Question n°5 : Que sait-on de la thermorésistance de <i>L. monocytogenes</i>, de sa résistance au pH, aux acides minéraux et organiques, aux hautes pressions et irradiations, aux désinfectants et conservateurs, aux substances antimicrobiennes naturelles produites par les plantes ?	14
• Thermorésistance	14
• pH	14
• Acides minéraux et organiques.....	14
• Hautes pressions et irradiations.....	15
• Désinfectants et conservateurs.....	15
• Substances antimicrobiennes naturelles produites par les plantes	16
Question n°6 : Quels sont les caractères importants de <i>L. monocytogenes</i> qui lui donnent ses potentialités de survie et de croissance dans l'environnement ?	16
Question n°7 : Que sait-on des interactions entre <i>L. monocytogenes</i> et les autres microorganismes ?	16
SECTION B : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	18
Question n°8 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement de <i>L. monocytogenes</i> en microbiologie des aliments ?	18
• Méthodes de détection.....	18
• Méthodes d'isolement.....	19
• Méthode de dénombrement.....	20
• Échantillonnage	20
• Influence du stress et des altérations	21
Question n°9 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement de <i>L. monocytogenes</i> en médecine humaine et vétérinaire ?	21
• En médecine vétérinaire	21
• En médecine humaine	21
• Identification de l'espèce <i>L. monocytogenes</i>	21
• Caractérisation des souches.....	22
Question n°10 : Quel est l'apport des outils de la biologie moléculaire dans l'isolement et l'identification de <i>L. monocytogenes</i> ?	22
Question n°11 : Les bactéries viables non cultivables sont-elles à prendre en compte d'une certaine façon ?	23
SECTION C : ÉCOLOGIE DE <i>L. MONOCYTOGENES</i>	24
Question n°12 : Que sait-on de la présence de <i>L. monocytogenes</i> dans l'environnement ?	24
Question n°13 : Que sait-on de l'écologie de <i>L. monocytogenes</i> dans les ensilages ?	25
Question n°14 : Que sait-on de la présence de <i>L. monocytogenes</i> dans l'environnement domestique ?	25
Question n°15 : Que sait-on de l'écologie de <i>L. monocytogenes</i> dans les différentes filières agro-alimentaires ?	26
• En élevages industriels de porcs	26
• En élevages industriels de volailles	26
• En industries de transformation des viandes	26

• En productions laitières	28
• En productions maraîchères et en productions de végétaux transformés	31
• Fruits de mer et poissons	32
Question n°16 : Quel est le rôle des biofilms dans la colonisation d'un milieu par <i>L. monocytogenes</i> ?	32
Question n°17 : L'adhésion de <i>L. monocytogenes</i> aux surfaces inertes est-elle le résultat de facteurs intrinsèques à ce micro-organisme ?	32
Question n°18 : Quel est le rôle de la nature de la surface sur l'adhésion ?	33
Question n°19 : Quel est l'apport des méthodes de biologie moléculaire à la connaissance de l'écologie de <i>L. monocytogenes</i> ?	33

SECTION D : PATHOLOGIE HUMAINE..... 34

Question n°20 : Quelles sont les formes cliniques de la listériose chez l'homme ?	34
• Listériose de la femme enceinte.....	34
• Listériose néonatale précoce.	34
• Listériose néonatale tardive	34
• La listériose invasive de l'enfant et de l'adulte	34
• Les listérioses non invasives.....	35
Question n°21 : Comment s'effectue le diagnostic biologique chez l'homme ?	35
• Diagnostic direct.....	35
• Diagnostic sérologique (détection d'anticorps).....	35
Question n°22 : Existe-t-il un ou des traitements de la listériose chez l'homme ?	35
• Sensibilité aux antibiotiques.....	35
• Traitement	36
Question n°23 : Quelles sont les suites d'une listériose chez l'homme ?	36

SECTION E : PATHOLOGIE ANIMALE 37

Question n°24 : Quels sont les animaux concernés par la listériose ?	37
Question n°25 : Quelles sont les formes cliniques de la listériose chez l'animal ?	37
• Forme génitale	37
• Forme nerveuse	37
• Forme digestive.....	38
• Formes septicémiques	38
• Autres formes localisées	38
Question n°26 : Comment s'effectue le diagnostic biologique de la listériose chez l'animal ?	40
• Diagnostic bactériologique	40
• Diagnostic sérologique	40
Question n°27 : Existe-t-il un ou des traitements de la listériose chez l'animal ?	40
• Sensibilité aux antibiotiques.....	40
• Traitement	40
Question n°28 : Quelles sont les suites de la listériose chez l'animal ?	40

SECTION F : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE 41

Question n°29 : Quelles sont les portes d'entrée de <i>L. monocytogenes</i> dans l'organisme ?	41
Question n°30 : Quelle est l'influence des conditions d'ingestion ? du statut gastro-intestinal ?	41
Question n°31 : Quel est le statut de <i>L. monocytogenes</i> vis-à-vis des protections humorales non-spécifiques ?	41
Question n°32 : Comment la bactérie pénètre-t-elle dans les tissus et les cellules ?	41
Question n°33 : Quels sont les moyens physiologiques de lutte contre <i>L. monocytogenes</i> et la possibilité de son élimination naturelle ?	42
Question n°34 : Quelle est l'histoire naturelle de <i>L. monocytogenes</i> dans l'organisme et dans les cellules ?	42
• La porte d'entrée digestive	42
• La multiplication hépatique.....	43
• L'infection du système nerveux central	43
• L'infection materno-infantile.....	44
• La listériose néonatale précoce.....	45
• La listériose néonatale tardive.....	45
Question n°35 : Quels statuts immunitaires influencent la maladie ?	45
• La sensibilité des divers groupes humains est-elle liée à l'immunité ?	45

• Quel est le rôle de paramètres non immunitaires dans la sensibilité ?.....	45
Question n°36 : Quelles sont les connaissances sur les facteurs de virulence de <i>L. monocytogenes</i> et leur variabilité ?.....	46
Question n°37 : Quels sont les facteurs environnementaux modulant la virulence ?.....	47
<u>SECTION G : RELATION DOSE-RÉPONSE</u>	<u>49</u>
Question n°38 : Que sait-on des expérimentations animales ?.....	49
• Chez les non-primates ?.....	49
• Chez les primates non-humains ?.....	49
Question n°39 : Quelle connaissance est extraite des épidémies ?.....	49
• Résultats des enquêtes réalisées sur les produits incriminés dans les épidémies (McLauchlin 1995).....	49
• Détermination de la dose infectante à l'aide de volontaires humains (Ward <i>et al.</i> 1986).....	50
• Détermination de la dose infectante à l'aide de l'interrogation d'experts.....	50
• Evaluation de la loi dose-réponse pour <i>L. monocytogenes</i> , à partir de données d'épidémiologie.....	50
<u>SECTION H : ÉPIDÉMIOLOGIE.....</u>	<u>52</u>
Question n°40 : Quelles sont les connaissances épidémiologiques de la listériose chez l'homme ?.....	52
• Quel est le système de surveillance de la listériose en France ?.....	52
• Quels sont les groupes à risque de listériose ? Quelle est la répartition des différentes formes cliniques de la listériose ?.....	52
• Que sait-on des fluctuations saisonnières ?.....	53
• Que sait-on de l'incidence de la listériose dans les autres pays ?.....	53
• Quelle est l'évolution de l'incidence de la listériose au cours des dernières années ?.....	53
• Que sait-on des portages humains ?.....	54
• Qu'est ce qu'une épidémie de listériose ? Pourquoi les détecter et réaliser des investigations ?.....	54
• Quel est le schéma actuel d'une investigation d'épidémie en France ?.....	54
• Qu'est-ce qu'un aliment à risque ? Quels sont les aliments mis en cause dans les listérioses humaines ?.....	55
• Quels ont été les aliments mis en cause lors des principales épidémies ?.....	56
• Quels sont les aliments mis en cause par les études sur les facteurs de risque des listérioses sporadiques ?.....	57
• Sur quelle base apprécier la probabilité d'exposition de la population ?.....	58
• Peut-on estimer une probabilité d'exposition moyenne ?.....	58
Question n°41 : Quelles sont les connaissances épidémiologiques sur la listériose chez l'animal ?.....	59
• Quelles sont les espèces animales touchées ? Quelle est la répartition selon les formes cliniques ?.....	60
• Quelles sont les catégories animales à risque ?.....	60
• Que sait-on des fluctuations saisonnières de l'incidence des listérioses animales ?.....	61
• Que sait-on de l'incidence de la listériose animale dans les autres pays ?.....	61
• Quelle est l'évolution de l'incidence de la listériose animale au cours des dernières années ?.....	61
Question n°42 : Existe-t-il des portages animaux ?.....	62
<u>SECTION I : RÈGLEMENTS ACTUELS (AU 1/07/00) ET CLASSEMENT DES ALIMENTS.....</u>	<u>64</u>
Question n°43 : Sur quelles bases peut-on estimer la densité maximale admissible d'un point de vue sanitaire ?.....	64
Question n°44 : Quelle est la position actuelle des règlements nationaux et internationaux ?.....	64
• Quelles orientations peuvent être prises pour une classification adaptée des aliments ?.....	66
Question n°45 : Comment déterminer des durées de conservation des produits ?.....	66
<u>SECTION J : MICROBIOLOGIE PRÉVISIONNELLE</u>	<u>68</u>
Question n°46 : Quels sont les principes généraux de la microbiologie prévisionnelle ?.....	68
Question n°47 : Quels modèles de croissance sont actuellement utilisés pour <i>L. monocytogenes</i> ?.....	68
Question n°48 : Comment modéliser la relation croissance de <i>L. monocytogenes</i> - température ?.....	70
• Modélisation de l'effet de la température.....	70
• La température minimale de croissance.....	71
• La température maximale de croissance.....	71
• La température optimale de croissance.....	71
Question n°49 : Comment modéliser la relation croissance de <i>L. monocytogenes</i>-pH ?.....	72
Question n°50 : Comment modéliser relation croissance de <i>L. monocytogenes</i>-a_w ?.....	72

Question n°51 : Comment modéliser la relation croissance de <i>L. monocytogenes</i> -O ₂ /CO ₂ atmosphère ?	72
Question n°52 : Comment modéliser la relation phase de latence - μ ?	72
Question n°53 : Que sait-on des modèles de relation mortalité-température (et autres facteurs) ?.....	72
Question n°54 : Quel est l'apport des modèles polynomiaux ?	74
Question n°55 : Quel est l'état de la connaissance dans le système prévisionnel français ?.....	74
Question n°56 : Peut-on utiliser actuellement ces analyses dans l'estimation de la Date Limite de Consommation ?.....	76
Question n°57 : Peut-on utiliser les données des contrôles pour estimer l'inoculum initial ?	77
Question n°58 : Quelles sont les autres applications des simulations numériques ?.....	77
<u>SECTION K : APPRÉCIATION DU RISQUE.....</u>	78
Question n°59 : Comment apprécier l'exposition à <i>L. monocytogenes</i> ?.....	78
• Estimation de la densité de <i>L. monocytogenes</i> dans le lait de vache pasteurisé	78
• Comparaison des consommations alimentaires et de la prévalence des <i>Listeria</i> dans les aliments	78
Question n°60 : Quelle est la prise en compte de la virulence, de ses variations, de la variabilité bactérienne ?	79
Question n°61 : L'appréciation quantitative du risque dans le cas de la listériose : quelles expériences ?	79
• Appréciation quantitative du risque de listériose au Canada	79
• Utilisation de l'appréciation quantitative du risque pour réduire l'incidence de listériose	79
• Évaluation quantitative du risque de listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait cru	80
Question n°62 : Quelle est la disponibilité des systèmes et leurs limites d'emploi ?	80
Question n°63 : Quelles sont les données utilisables de façon fiables et les données absentes ?	80
• Évaluation de la loi dose-réponse pour <i>L. monocytogenes</i> à partir de données d'épidémiologie-surveillance	80
• Étude expérimentale chez la souris de la loi dose-réponse pour <i>L. monocytogenes</i>	80
Question n°64 : Quelle est la fiabilité des expériences actuelles ?.....	81
Question n°65 : Peut-on utiliser actuellement ces analyses dans l'estimation du seuil maximal admissible ?	81
Question n°66 : Que faudrait-il pour arriver à ce but ?	81
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	82
<u>ANNEXE 1 : FORMES CLINIQUES DES LISTÉRIOSES CHEZ L'ANIMAL</u>	106
<u>ANNEXE 2 : EXPLORATION PAR SIMULATION DES FACTEURS MODULANT LA DLC ?.....</u>	109
<u>ANNEXE 3 : CONTRIBUTIONS REÇUES PAR LA COMMISSION SUITE À LA PUBLICATION DU RAPPORT INTERMÉDIAIRE</u>	115
• Contribution de la Sarl ASEPT et de l'Association ASEPT	115
• Contribution du groupe microbiologie et évaluation des risques du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (Compte Rendu de la réunion du 8 juin 2000)	121
• Contribution du laboratoire d'épidémiologie et d'analyse des risques de l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.....	123
• Contribution de l'Institut de l'Élevage	129
• Contribution de l'Interprofession Laitière (CNIEL).....	131
• Contribution de la Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs et Transformateurs de Viande (FICT) ...	137
• Contribution de l'Académie Vétérinaire de France.....	140
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</u>	141

INTRODUCTION AU RAPPORT,

par Jean-Pierre Flandrois, Président de la Commission

En complet accord et avec l'aide attentive de la Direction Générale de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA), la Commission *Listeria* a cherché à répondre au mieux à une saisine des Ministères de tutelle de l'Agence, tout en explorant une voie originale de travail incluant une large information sur ses travaux et en mettant en place les moyens d'une interaction avec les citoyens et les professions de l'agro-alimentaire.

Saisine de l'AFSSA

Des évènements récents - retraits de certains aliments de la consommation ou annonce d'épidémies d'infection - ont rappelé l'importance du risque que la bactérie *Listeria monocytogenes* représentait pour certains sujets.

La consommation d'aliments contenant cette bactérie peut provoquer, dans certains cas et certaines conditions, une infection grave aussi appelée listériose. L'infection due à cette bactérie est une infection rare mais très grave atteignant les femmes enceintes, leur nouveau-né, les personnes ayant une diminution de leurs défenses immunitaires.

Dans ce contexte, le 2 juillet 1999, l'AFSSA a été chargée par

- le Ministre de l'agriculture et de la pêche,
- le Secrétaire d'État à la Santé et à l'Action Sociale et
- le Secrétaire d'État aux Petites et Moyennes Entreprises, au Commerce et à l'Artisanat,

d'une mission « D'ACTUALISATION DE L'ÉVALUATION DU RISQUE SANITAIRE LIÉ À *LISTERIA MONOCYTOGENES* AU STADE DE LA DISTRIBUTION COMMERCIALE » :

« Les récentes alertes liées à une contamination de produits par des *Listeria* ont mis en évidence la nécessité d'actualiser différentes connaissances épidémiologiques en matière de *Listeria monocytogenes*.

Dans ce contexte, les autorités en charge de la gestion de ce risque alimentaire souhaitent disposer rapidement de l'ensemble des éléments d'évaluation du risque leur permettant d'adapter, au mieux des connaissances récentes, leur protocole de gestion dans ce domaine.

Pour répondre à cet objectif, il nous est nécessaire de disposer d'une actualisation des différentes données disponibles en matière de listériose, en particulier dans les domaines suivants :

- épidémiologie de la maladie ;
- relation dose-réponse ;
- variabilité microbienne, en particulier facteurs de virulence ;
- influence des conditions d'ingestion et du type d'aliment ;
- statut immunitaire influençant la maladie ;
- appréciation de la probabilité d'exposition de la population moyenne ;
- paramètres déterminants d'écologie microbienne.

D'éventuelles données portant notamment sur la microbiologie prévisionnelle pourraient s'avérer particulièrement utiles. Les points concernant l'épidémiologie de la maladie et les aspects microbiologiques pourraient être étudiés en liaison avec l'InVS (Institut national de Veille Sanitaire) et le CNR (Centre National de Référence) des *Listeria*.

L'ensemble de ces données servira de base à d'éventuelles modifications du seuil maximal admissible actuellement en vigueur au stade de la consommation. »

Création de la Commission

Début juillet 1999, la Direction Générale de l'AFSSA demandait au Professeur J.-P. Flandrois de prendre la présidence de cette commission qui était fonctionnelle le 26 août 1999.

Composition

Les objectifs scientifiques fixés par la saisine ont conduit à la composition suivante :

Patrick BERCHE, Professeur, Praticien Hospitalier, Chef de Service des Hôpitaux ;
Anne BRISABOIS Chargée de Recherches AFSSA ;
Michel CATTEAU Direction des Enseignements - INSTITUT PASTEUR de Lille ;
Jean-Pierre FLANDROIS (Président) Professeur, Praticien Hospitalier, Chef de Service des Hôpitaux ;
Jean-Claude LABADIE, Directeur de Recherche INRA ;
Jocelyne ROCOURT, Chef de Laboratoire INSTITUT PASTEUR - Centre National de Référence des *Listeria* ;
Gilles SALVAT, Chef d'Unité AFSSA ;
Véronique VAILLANT, Médecin épidémiologiste, InVS ;
Josée VAISSAIRE, Ingénieur de Recherche, AFSSA ;
Dominique VIDON, Professeur Faculté de Pharmacie, Strasbourg ;
Robert VRANCKX, INSTITUT DE SANTE PUBLIQUE, Bruxelles au titre de Correspondant étranger.

Cécile Lahellec, Directrice de l'hygiène des aliments et Ambroise Martin, Directeur de l'Évaluation des risques nutritionnels et sanitaires ont été chargés de suivre l'évolution du travail de la Commission.

Les membres de la Commission ont reçu, ponctuellement et sous leur responsabilité, de l'aide d'experts extérieurs sur des points précis.

Il convient de remercier particulièrement pour leur aide Régis Pouillot, vétérinaire épidémiologiste, AFSSA, Marie Tschora, secrétaire UMR 55-58, université Lyon I, Agnès Grebot et Mireille Dufrêne, documentalistes, AFSSA.

Déontologie scientifique

Les membres de la Commission *Listeria monocytogenes* de l'AFSSA ont individuellement souscrit à la « Charte d'Éthique du Scientifique » ci-dessous ou à la « Charte d'Éthique du Microbiologiste », de la Société Française de Microbiologie, dont elle est directement issue.

« Le scientifique doit exercer son activité avec compétence et intégrité. La compétence implique le souci constant d'améliorer ses connaissances pour atteindre le plus haut niveau technique possible dans son domaine d'activité. L'intégrité implique l'intégrité scientifique, l'absence d'ingérence dans les décisions professionnelles, et le respect des lois et règlements, dont ceux concernant la profession.

Dans toutes les circonstances, la réalité du fait scientifique doit être respectée. Dans la production scientifique, s'assurer de la qualité des données utilisées et permettre à d'autres de vérifier cette qualité constitue le fondement de l'éthique scientifique. La présentation des résultats appelle la même attention et les conclusions avancées doivent en être directement issues. La bonne foi de l'expérimentateur est sous-entendue dans le domaine scientifique mais la vérification, la remise en question fait aussi partie du devoir du scientifique. L'indépendance du scientifique vis-à-vis des pressions éventuelles garantit le respect du fait scientifique et la validité des conclusions. Les activités d'expertise ou d'évaluation doivent respecter les mêmes règles fondamentales. »

Les membres de la Commission ont par ailleurs rempli la déclaration d'intérêt des experts de l'AFSSA.

Le travail de la Commission

Le travail de la Commission a comporté plusieurs phases :

- Phase 1 : Identification de l'ensemble des questions ;
- Phase 2 : Rédaction du rapport intermédiaire ;
- Phase 3 : Retour d'information du public et des professionnels ;
- Phase 4 : Rapport final.

Parallèlement au travail de la commission, un site INTERNET était mis en place afin de donner des informations, d'exposer le travail de la commission et de permettre des réactions du public sur un forum de discussion.

Une liste de questions

La mission, telle que définie ci-dessus, imposait de documenter de façon précise certains points du comportement de *Listeria monocytogenes* tout en les insérant dans une problématique plus grande. Il est apparu, lors de la préparation du travail de la commission, que le moyen le plus simple était de d'étendre le mode de travail proposé en préparant une liste de questions dont la réponse constituerait le rapport final. Toute

la problématique devait donc être présentée sous formes de questions, l'ensemble des questions donnant une structure à la réflexion globale de la Commission. Parmi les avantages de cette présentation en « questions structurantes » on retiendra le fait de pouvoir traiter chaque point individuellement, comme une fin en soi et donc la possibilité d'un travail indépendant sur chaque point ainsi que la possibilité pour le lecteur de ne pas avoir à considérer l'ensemble du travail pour comprendre un point précis.

Pour constituer la liste de ces questions, une étude extensive des bases de données bibliographiques a été réalisée, non pas pour constituer un corpus de connaissances à prendre en compte, mais pour permettre une certaine exhaustivité au travail du groupe d'experts.

La liste d'une centaine de questions a été validée lors de la réunion fondatrice de la Commission. Par la suite un regroupement en grandes sections a été utilisé et des questions supplémentaires ont été ajoutées.

La Commission a souhaité limiter, au moins dans un premier temps, son travail à la réponse aux questions sur la base des faits scientifiques, elle n'a pas émis d'hypothèses ni tiré de conclusions. C'est donc essentiellement un travail de présentation de la connaissance qui devait être effectué.

Afin de garantir son indépendance, la Commission a travaillé sans inclure parmi ses membres de représentants du monde industriel, mais le rapport intermédiaire a été ouvert à la discussion avec industriels et consommateurs et a été enrichi des apports scientifiques de ces contributeurs.

Le rapport

Travail de rédaction

La Commission a essentiellement travaillé par voie électronique ce qui garantit efficacité et rapidité en limitant les difficultés de fonctionnement. Les documents transmis par les membres ont été accessibles à tous sur un site INTERNET de travail.

Les réponses aux questions ont été apportées par les membres de la Commission dès le mois d'octobre 1999. L'essentiel du travail était terminé au tout début de l'année 2000 et aurait pu être communiqué en l'état. La Commission a cependant estimé que la documentation de points supplémentaires était indispensable et qu'une harmonisation profonde des textes s'imposait. Par ailleurs lors de ses séances de travail, certains points ont été identifiés comme particulièrement importants ou mal connus et des ajouts ont ainsi été décidés. De ce fait l'importance même du travail et la densité des réponses que chacun devait valider ne permettait pas une publication rapide. La Commission est consciente que le retard de publication du rapport est important, mais elle estime que les délais supplémentaires ont permis d'atteindre un degré de complétion, de qualité scientifique et de consensus que n'aurait pas eu un rapport rendu plus précocement.

Nature du rapport

Le rapport correspond à un document de niveau scientifique. C'est la réponse actuelle de la Commission aux questions posées. Les questions ont été rassemblées en 66 questions principales, mais on retrouvera les questions structurantes initiales.

La Commission souhaite que soit bien pris en compte les points suivants :

- Le rapport intermédiaire a été modifié ponctuellement et des apports scientifiques nouveaux ont été pris en compte ;
- Il a donc été ouvert à des interactions avec l'extérieur ;
- Dans son état actuel, le rapport constitue une base documentaire importante mais il n'est pas accompagné de conclusions.

La base documentaire apportée par la Commission est importante, cependant la commission a dû faire des choix dans la masse importante de la littérature publiée. Comme de nombreuses connaissances restent du domaine industriel, le travail de la commission pourra apparaître incomplet, mais ces faits ne peuvent pas être pris en compte dans un travail de type strictement scientifique. La Commission espère beaucoup des apports ultérieurs et est, dans son ensemble, extrêmement ouverte à ces coopérations. Les informations supplémentaires qui ont été introduites dans le rapport final donneront plus de poids aux conclusions possibles.

La Commission a cependant ouvert des pistes de réflexion, tant sur le développement de recherches futures que sur des régulations possibles. Elle a considéré qu'aller au-delà nécessitait une réflexion ciblée pour laquelle elle n'était pas, dans sa composition actuelle, totalement adaptée.

Il ne s'agit pas d'un travail sur l'estimation du risque, même si les données explicitées sont toutes individuellement utilisables à cet effet. Le rapport ne reprend pas, en particulier, le schéma proposé dans ce but par le *Codex Alimentarius*. Mais il s'agit d'une mise au point sur un ensemble de connaissances ayant trait au risque alimentaire dû à *Listeria monocytogenes*. Ce travail a permis d'identifier les facteurs de risque mais n'a pas permis de les hiérarchiser sur les bases scientifiques disponibles.

L'interaction avec le public et les professionnels

Lors de la mise en place de la Commission, le choix de travailler avec un groupe restreint avait été retenu afin de garantir son indépendance et une progression aussi rapide que possible. Des informations en provenance de l'extérieur ont été cependant introduites dans un second temps.

Cet enrichissement du travail de la Commission a pu se faire à partir d'un rapport intermédiaire publié fin avril 2000. Les professionnels de la santé et de l'agro-alimentaire, les associations de consommateurs, les citoyens ont eu ainsi la possibilité de participer de façon active au rapport définitif. Cette interaction est le gage d'une grande exhaustivité et de la description et de la prise en compte des réalités sociales et industrielles qui sont essentielles dans la maîtrise du risque de listériose. La qualité des interventions extérieures à la Commission est essentielle dans leur prise en compte dans le rapport final.

Cette interaction, vivement souhaitée par la Commission, explique la création du site INTERNET et des forums de discussion.

Le document final

1) Le document final répond aux questions posées, vise à être informatif, rigoureux (contrôlable) et à s'ouvrir vers l'aspect quantitatif (même flou) : un des objectifs de la commission a été de permettre une réflexion sur des normes de densité admissibles.

2) Il permet différents niveaux de lecture et d'explications :

- Niveau scientifique (pour des experts médecins, vétérinaires ou biologistes)
- Niveau intermédiaire
- Niveau grand public (compréhensible à un public qui n'est ni médecin, ni biologiste, sans introduire de biais ou d'erreurs sur le fond).

3) Il s'accompagne de références vérifiables, en l'occurrence des articles scientifiques ou de la « littérature grise ». Les références sont, sur demande, consultables par un tiers.

Ceci ne supprime pas l'expression de sentiments, d'interprétations, la présentation de faits scientifiques non publiés ou de résultats partiels. Nous avons cherché à les rendre identifiables dans le texte.

D'une façon générale la Commission s'est efforcée de séparer les faits des interprétations et des suppositions et des propositions éventuelles.

Site INTERNET et information

Un site INTERNET a été progressivement installé pour l'information du public et aussi pour recevoir des avis, des contributions (forum). Il a été fonctionnel à partir de la fin décembre 1999.

Les objectifs étaient :

- d'informer de l'existence, les objectifs, le mode de fonctionnement ;
- de rendre publiques les « questions structurantes » ;
- d'informer sur la progression du travail de la Commission ;
- de recevoir des questions et des informations éventuelles des citoyens et des professionnels (forum de discussion).

Du fait des demandes transmises à la Commission sur le forum de discussion, dans le contexte des alertes et des deux épisodes de cas reliés de listériose (fin 1999 et début 2000), le site de la Commission a vu son rôle étendu à l'information des professions médicales et du public sur les conduites à tenir et à l'information sur les épidémies et la réglementation actuelle.

Pendant les mois de janvier et février, le site a reçu 30000 visites.

Parallèlement la Commission a œuvré à l'information du public en coopération avec les médias.

Ainsi, le rapport est-il un document scientifique qui peut être déjà une source d'information pour les chercheurs, les industriels et le public. Les pistes de réflexion, tant sur le développement de recherches futures que sur des régulations possibles sont aisées à envisager à la lecture de ce rapport. Même s'il elle apparaît comme constituée une base documentaire importante sur *Listeria monocytogenes*, cette connaissance ne doit pas être considérée comme exhaustive, la commission ayant dû faire des choix dans l'abondante littérature existante. Par ailleurs de nombreuses observations n'ont pas fait l'objet de publications et restent du domaine de la connaissance industrielle. Elles n'ont pu être prises en compte, car non valablement publiées.

SECTION A : PHYSIOLOGIE DE *L. MONOCYTOGENES*

Question n°1 : Quels sont les caractères bactériologiques de *L. monocytogenes* ?

- L. monocytogenes* est un bacille à Gram positif se présentant sous forme de bâtonnets réguliers de 0,5-2,0 µm de longueur sur 0,4-0,5 µm de diamètre, aux extrémités arrondies, associés parallèlement, ou en courtes chaînes, ou en paires sous forme de V. Dans les cultures âgées et en milieux carencés, des filaments de 6 à 20 µm peuvent se former.
- La bactérie n'est ni capsulée ni sporulée. Elle est mobile par des flagelles péritriches quand elle est cultivée à 20-25°C, et immobile ou faiblement mobile à 37°C.
- Elle est capable de se développer en atmosphère aérobie ou anaérobie. Sur gélose nutritive, elle forme en 24-48 h à 37°C des colonies de 0,5 à 1,5 mm de diamètre, translucides, à reflets bleutés en lumière oblique. La catalase est positive et la réaction de l'oxydase est négative. Sur gélose au sang de mouton ou de cheval, elle donne des colonies -hémolytiques.
- La bactérie produit de l'acide à partir du glucose en produisant essentiellement de l'acide L(+)-lactique.
- Outre *L. monocytogenes*, le genre *Listeria* comprend 5 autres espèces, non pathogènes pour l'homme : *L. innocua*, *L. ivanovii* (subspécies *ivanovii* et subspécies *londoniensis*) *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Seeliger et Jones 1986). *L. ivanovii* est responsable d'avortements chez les bovins et les caprins. Les caractères distinctifs des espèces sont données dans le **Tableau I** (Rocourt et Jacquet 2000). Aucune espèce de *Listeria* ne réduit les nitrates en nitrites.
- Dans la pratique, il peut être utile de différencier *L. monocytogenes* et les autres *Listeria* de certains genres pouvant donner des colonies d'aspect voisin, en particulier sur gélose au sang (**Tableau II**).

Tableau I Caractères bactériologiques différenciant les espèces de *Listeria* (+ : positif ; - : négatif) (Rocourt et Jacquet 2000).

	Hémolyse	CAMP test <i>S. aureus</i> *	CAMP test <i>R. equi</i> **	D-xylose	L-rhamnose	méthyl D-mannosi de	Ribose	Mannitol
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>L. ivanovii</i> (subsp <i>ivanovii</i>)	+	-	-	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i> (subsp <i>londoniensis</i>)	+	-	+	+	-	variable	-	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	variable	+	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	variable	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	non défini	-	+

* *Staphylococcus aureus* ; ** *Rhodococcus equi*

Tableau II Caractères différenciant les *Listeria* de genres bactériens présentant des caractères phénotypiques voisins (d'après Rocourt et Jacquet 2000) (+ : positif ; - : négatif).

	<i>Listeria</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Enterococcus</i> <i>Streptococcus</i>
Mobilité à 25°C (peu mobile à 37°C)	+	-	-	-
Catalase	+	-	+	-
Esculine (positivité en 2-3 heures)	+	-	-	variable
H ₂ S	-	+	-	-
Inclusions métachromatiques	-	-	+	-

Question n°2 : Que sait-on des conditions de développement de *L. monocytogenes* ?

- Que sait-on des besoins pour la croissance, des milieux favorables et de l'environnement ?
 - 7 *L. monocytogenes* se développe bien dans les milieux empiriques riches (milieu coeur-cerveille, milieu à la peptone de caséine et de soja additionné d'extrait de levure). L'apport d'esculine et de citrate de fer stimule la croissance. En milieux synthétiques, ses exigences de base concernent certains amino-acides, des vitamines, mais pas de bases nucléiques (Welshimer 1963 ; Premaratne *et al.* 1991 ; Phan-Thanh et Gormon 1997).
- Que sait-on des besoins en fer et l'effet de la carence ?
 - 8 *L. monocytogenes* ne peut pas se développer dans des milieux carencés en fer. En milieu synthétique de Welshimer (1963), la croissance de *L. monocytogenes* est stimulée par l'addition de fer (Fe^{3+}) et cet effet stimulant est proportionnel à la concentration de fer ajouté (Sword 1966).
 - 9 L'acquisition du fer par *L. monocytogenes* s'effectue par plusieurs mécanismes. Un premier système, répandu chez les diverses espèces de *Listeria* (Deneer et Boychuk 1993), consiste en une réductase ferrique extracellulaire ou membranaire (Deneer *et al.* 1995) transformant le fer ferrique, non assimilable, en fer ferreux biodisponible (Coward et Foster 1985 ; Adams *et al.* 1990). Un second système, inductible, permet le transport spécifique du citrate de fer (Adams *et al.* 1990). *L. monocytogenes* peut également utiliser directement le fer lié à la transferrine sérique grâce à des récepteurs spécifiques, quelle que soit l'origine, humaine, bovine, équine ou murine, de la transferrine (Hartford *et al.* 1993). Enfin *L. monocytogenes* est capable d'utiliser des sidérophores exogènes de nature variée (catécholates, hydroxamates) d'origine microbienne, ainsi que de nombreuses substances naturelles de structure analogue aux catécholates (dont des substances d'origine végétale et les catécholamines) pour capter le fer séquestré dans le milieu (Simon *et al.* 1995 ; Coulanges *et al.* 1997).

Question n°3 : Que sait-on de l'influence de la température sur la croissance de *L. monocytogenes* ?

- 10 La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C (ce point est par ailleurs discuté dans la section J consacrée à la Microbiologie prévisionnelle). La croissance est démontrée expérimentalement entre -2°C et +45°C (Augustin 1999).
- 11 Les températures minimales de croissance observables sur gélose trypticase-soja dans une durée d'incubation de 10 jours sont comprises entre +0,5°C et +3,0°C, avec une moyenne de +1,1°C (Junttila *et al.* 1988). Si le temps d'incubation est supérieur à 50 jours, la température minimale de croissance atteint - 0,4°C selon Walker *et al.* (1990), voire des valeurs inférieures (Bajard *et al.* 1996).
- 12 A titre d'exemple, le **Tableau III** montre les taux de croissance aux différentes températures de 2 souches de *L. monocytogenes* étudiées par Bajard *et al.* (1996). Ces données montrent que si un taux de croissance positif est détecté à des températures inférieures à 0°C, celui-ci est extrêmement faible, et la croissance n'est observable que pour de longues périodes d'incubation. Par ailleurs, une forte hétérogénéité des taux de croissance a été décrite (Bégot *et al.* 1998 ; Augustin 1999). Plus généralement le comportement de *L. monocytogenes* semble souche-dépendant quelque soit les facteurs étudiés (température, pH, a_w), les aliments (laits, fromages, etc.). On ne connaît pas actuellement la distribution des paramètres de la croissance dans une population de *L. monocytogenes*.
- 13 La représentation la plus classique de μ_{\max} en fonction de la température est la représentation en racine carrée (Ratkowsky *et al.* 1982). Pour la majorité des bactéries étudiées jusqu'alors, la relation entre $\sqrt{\mu_{\max}}$ et les températures sub-optimales peut être traduite par une droite. Cette représentation a permis de mettre en évidence pour *L. monocytogenes* ce que l'on a appelé l'« anomalie *L. monocytogenes* » (Bajard *et al.* 1996), c'est-à-dire une non conformité du comportement de *L. monocytogenes* par rapport à celui des autres bactéries.
- 14 La **Figure 1** montre que pour *L. monocytogenes*, contrairement à *Escherichia coli* (Barber 1908), la relation $\sqrt{\mu_{\max}}$ - températures sub-optimales n'est pas linéaire. Il existe en effet une cassure de pente à une température comprise entre 10°C et 15°C. Cette température de cassure a été appelée température caractéristique et notée T_c pour des raisons à la fois mathématiques et biologiques.

Tableau III Taux de croissance maximum (μ_{\max} , h^{-1}) en fonction de la température (en °C) pour *L. monocytogenes* CIP 7831 et Scott A. Le modèle de croissance est le modèle exponentiel (la latence n'est pas prise en compte). Les valeurs entre crochets correspondent aux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %).

Température (°C)	<i>L. monocytogenes</i> CIP 7831		<i>L. monocytogenes</i> Scott A	
	μ_{\max} (h^{-1})	IC95 %	μ_{\max} (h^{-1})	IC95 %
-2,0	0,009	[0,006-0,011]	0,009	[0,006-0,012]
-0,5	0,014	[0,011-0,017]		
0,0	0,014	[0,010-0,018]		
0,5	0,016	[0,013-0,020]		
1,5	0,023	[0,017-0,028]		
2,5	0,034	[0,029-0,040]	0,031	[0,025-0,036]
3,5	0,038	[0,030-0,046]		
4,5	0,043	[0,034-0,052]		
5,0			0,058	[0,050-0,065]
5,5	0,060	[0,055-0,065]		
7,5	0,080	[0,071-0,089]	0,094	[0,084-0,103]
9,0	0,101	[0,092-0,110]		
10,0			0,148	[0,130-0,166]
11,0	0,142	[0,110-0,173]		
12,5			0,234	[0,207-0,261]
13,0	0,197	[0,181-0,213]		
15,0	0,264	[0,221-0,307]	0,312	[0,261-0,362]
17,0	0,321	[0,289-0,353]		
17,5			0,385	[0,318-0,451]
19,0	0,378	[0,352-0,403]		
20,0	0,533	[0,452-0,614]	0,794	[0,702-0,887]
22,0	0,563	[0,464-0,662]		
25,0	1,080	[0,986-1,175]	0,994	[0,911-1,076]
30,0	1,205	[0,974-1,436]	1,380	[1,206-1,555]
34,0	1,431	[1,188-1,674]		
37,0	1,250	[1,124-1,375]	1,360	[1,175-1,550]
42,0	0,590	[0,523-0,656]	1,080	[0,999-1,158]

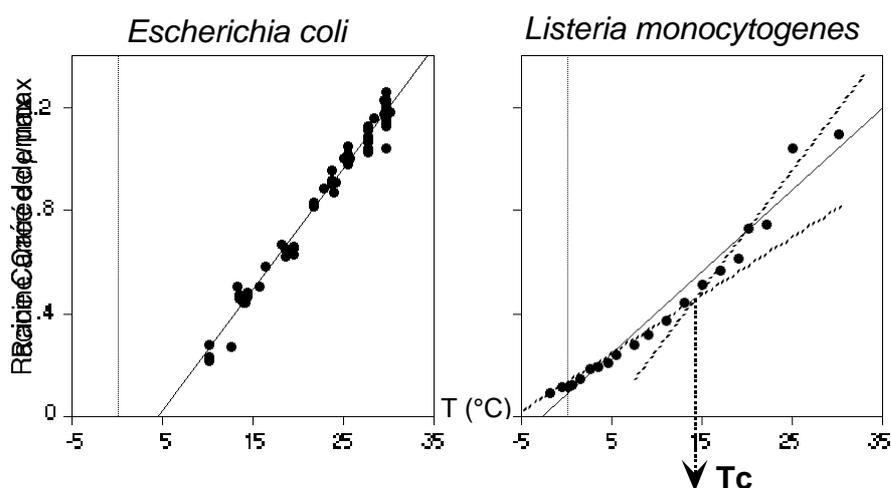


Figure 1 Représentation en racine carrée de la relation $\sqrt{\mu_{\max}}$ - température pour *E. coli* et *L. monocytogenes* CIP 7831. La droite en trait plein est celle attendue pour les bactéries classiques ; les droites en pointillés mettent en évidence une cassure de pente à T_c pour *L. monocytogenes*.

- 15 Cette non conformité au modèle général peut engendrer une erreur d'estimation de la température théorique de non développement (T_{\min}) ; elle reste cependant marginale et dans la pratique de la microbiologie prévisionnelle par simulation (cf. Section J), elle peut être négligée.

Question n°4 : Que sait-on de la croissance de *L. monocytogenes* selon le pH, l'activité de l'eau et la teneur en NaCl ?

- 16 *L. monocytogenes* se multiplie selon Pearson et Marth (1990) entre pH 4,6 et pH 9,6 avec un optimum à pH 7,1 à l'optimum thermique. Ces valeurs (« pH cardinaux ») dépendent toutefois de la nature et de la concentration de l'acide, et de la nature du milieu (cf. paragraphes 1 et 21)
- 17 L'activité de l'eau (a_w) minimale (Farber *et al.* 1992) pour la croissance pour *L. monocytogenes* est de 0,90 quand le glycérol est utilisé pour ajuster ce facteur dans le milieu, de 0,92 ou 0,93 avec du NaCl et du saccharose ou si le milieu employé est à base d'extrait de viande (Chen et Shelef 1992 ; Farber *et al.* 1992 ; Miller 1992 ; Nolan *et al.* 1992).
- 18 *L. monocytogenes* ne se développe en général pas dans les solutions contenant plus de 10 % à 11 % de NaCl (Nolan *et al.* 1992 ; Vasseur *et al.* 1999). Toutefois, des souches peuvent survivre dans des saumures de fromagerie contenant de 13 à 14 % de NaCl (Farber *et al.* 1992) mais pas dans un milieu de culture salé à 12 % (Nolan *et al.* 1992) ; la survie dans une saumure à 25 % de NaCl après un choc thermique de 1 h à 45°C a été décrite (Lou et Yousef 1997). Kukharkova *et al.* (1960) ont démontré que *L. monocytogenes* survivait plus de 60 jours dans de la viande stockée à 4°C dans une solution de saumure à 30 % de NaCl qui contenait aussi des nitrates. Sielaff (1968) a mis en évidence *L. monocytogenes* dans de la viande de bœuf saumurée dans une solution à 22 % de NaCl, après stockage pendant 100 jours entre 15 et 20°C.

Question n°5 : Que sait-on de la thermorésistance de *L. monocytogenes*, de sa résistance au pH, aux acides minéraux et organiques, aux hautes pressions et irradiations, aux désinfectants et conservateurs, aux substances antimicrobiennes naturelles produites par les plantes ?

• Thermorésistance

- 19 *L. monocytogenes* n'est pas considérée comme un germe thermorésistant et est rapidement détruite à 60°C (Bréand *et al.* 1998). Toutefois, l'effet de divers pré-traitement thermiques peut beaucoup influencer sa thermotolérance. Ainsi, un préchauffage à 47,5°C pendant 3 heures (Pagan *et al.* 1997) est celui qui prolonge le plus la résistance ultérieure à une température de 65°C, des bactéries cultivées initialement à 4°C. Il est intéressant de noter également qu'un préchauffage de 3 heures à 37°C, avant un traitement à 62°C, entraîne à peu près les mêmes conséquences et dans les mêmes proportions. Ces résultats qui confirment ceux de Linton *et al.* (1990) montrent que la faculté de préadaptation des *L. monocytogenes* aux traitements thermiques est réelle. Il est possible que cette faculté contribue à la survie de *L. monocytogenes* dans certains aliments subissant, au cours du processus de fabrication, un préchauffage avant pasteurisation.

• pH

- 20 *L. monocytogenes* est rapidement détruite au-dessus de pH 10 ou aux pH inférieurs au pH_{\min} (Marron *et al.* 1997 ; Vasseur *et al.* 1999). Elle peut toutefois survivre pendant de très longues périodes à des pH proches de pH 4 comme c'est le cas dans les ensilages de maïs sans que l'on connaisse l'origine génétique ou adaptative du phénomène (O'Driscoll *et al.* 1996 ; Ryser *et al.* 1997 ; Phan-Thanh et Montagne 1998). Cette résistance pourrait correspondre à une adaptation croisée induite par un stress homologue (O'Driscoll *et al.* 1996), ou hétérologue (Kroll et Patchett 1992 ; Lou et Yousef 1997). Un stress alcalin (NaOH, pH 9) est rapidement surmonté par *L. monocytogenes* (Cheroutre-Vialette *et al.* 1998).

• Acides minéraux et organiques

- 21 Concernant les acides organiques, divers travaux ont été conduits dans le but d'évaluer la survie et/ou la croissance de *L. monocytogenes* dans des milieux modèles de bas pH. Dans ces systèmes, le pH est ajusté avec des acides minéraux (HCl, H₂SO₄) ou organiques (acétique, citrique, lactique et/ou propionique), utilisés seuls ou en combinaisons. Le pH le plus bas auquel *L. monocytogenes* peut survivre et se multiplier dépend de l'acide utilisé (Conner *et al.* 1990 ; Bremer et Osborne 1995). Ainsi, des pH minima de pH 4,5 à pH 5,6 sont cités à 5°C pour l'acide acétique, de pH 4,5 à pH 5,5 pour l'acide lactique, de pH 4,0 à pH 4,6 pour l'acide citrique, et de pH 4,0 à pH 5,2 pour l'acide chlorhydrique. En dessous du pH

minimum la mort cellulaire s'observe après une phase de latence qui peut durer longtemps. L'abaissement du pH par de l'acide acétique est plus stressant sur des bactéries en phase de croissance active que sur des bactéries en phase de latence (Cheroutre-Vialette *et al.* 1998). Dans le jus d'orange acidifié avec de l'HCl, cette latence est de 1 à 4 jours à pH 3,6 et de 28 à 36 jours à pH 4,4. L'activité bactéricide ou bactériostatique des acides organiques varie avec l'acide. Ainsi, les travaux de Sorells *et al.* (1989) notamment, ont établi un classement en faisant varier la température et l'acide utilisé. A 10, 25 et 35°C, l'acide le plus inhibiteur est incontestablement l'acide acétique suivi de l'acide lactique, puis de l'acide citrique. Des observations similaires ont été faites par différents auteurs, dont Conner *et al.* (1990) et Vasseur *et al.* (1999). Pour expliquer ce classement, la plupart de ces auteurs s'accordent pour dire que l'effet observé provient probablement du fait que les acides organiques à l'état non dissocié pénètrent facilement à travers la membrane plasmique à l'intérieur des cellules. Bien entendu, l'importance quantitative de ces formes dépend du pKa des acides utilisés. L'acide acétique (pKa 4,76) à pH 5,4 est moins dissocié que l'acide lactique (pKa 3,86). Au même pH, l'acide chlorhydrique l'est totalement ce qui explique sa moindre efficacité. La valeur du pH minimum est strictement liée au pKa de l'acide (Rosso *et al.* 1997).

- Hautes pressions et irradiations

- 22 Face à l'effet des hautes pressions, il apparaît que *L. monocytogenes* n'est pas un germe très résistant comparativement à d'autres germes pathogènes tels *Salmonella* Enteritidis, *E. coli* O157 H7 ou *S. aureus*. Il faut néanmoins appliquer 375 MPa pendant 15 minutes (Cheftel et Culioli 1997) pour réduire la population de 5 unités Log₁₀ à 20°C. Comme pour beaucoup d'autres paramètres, la résistance varie beaucoup selon les souches et selon le milieu de culture utilisé. Ainsi *L. monocytogenes* NCTC 11994 est plus résistante dans le lait que dans la viande de poulet ou en tampon phosphate. L'origine de ces différences est actuellement inconnue.
- 23 La résistance à l'irradiation de *L. monocytogenes* est faible et une dose de 2 kGy est suffisante pour détruire les *L. monocytogenes* aux inoculums habituellement rencontrés dans les aliments (Osterholm et Potter 1997). La dose de réduction décimale (D₁₀) se situe, suivant la température et la nature de l'aliment irradié (rayons gamma), entre 0,25 et 0,77 kGy, avec une moyenne aux environs de 0,56 kGy (Huhtanen *et al.* 1989 ; Monk *et al.* 1994).

- Désinfectants et conservateurs

- 24 Des études ont montré que *L. monocytogenes* est sensible à différents agents couramment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire tels que les dérivés chlorés, les dérivés iodés, les acides anioniques ou les ammoniums quaternaires, lorsqu'ils sont utilisés à des concentrations respectives de 100 ppm, 25-45 ppm, 200 ppm et 100-200 ppm (Lopes 1986 ; Orth et Mrozek 1989). Il est nécessaire de procéder à un rinçage des surfaces après l'action des agents désinfectants. D'après de nombreuses études dont celle de Best *et al.* (1990), beaucoup d'entre eux sont inefficaces en présence de matières organiques (lait, sérum, matières grasses). Toutefois la combinaison de glutaraldéhyde et d'ammoniums quaternaires tensio-actifs permet de lever l'inhibition liée aux matières grasses. Parmi toutes les molécules testées, certaines sont peu affectées par les protéines, le complexe iode-PVP, le gluconate de chlorhexidine et le glutaraldéhyde. Malgré cette efficacité, qui pourrait les rendre particulièrement intéressantes, ces mêmes molécules se révèlent inefficaces en présence de 2 % de matières grasses. Seul le dichloro-isocyanurate est actif en présence de lait entier.
- 25 Parmi les molécules les plus bactéricides, la monolaurine (monoester d'acide laurique) est la plus efficace en présence d'acide lactique 18 mM (Oh et Marshall 1994) ou en solution alcaline à pH 10,5 avec du NaCl à 10 % (Vasseur *et al.* 1999). D'autres molécules telle que la lauryl dipropylène triamine sont également létales dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la monolaurine (Vasseur *et al.* 1999).
- 26 Parmi les agents de conservation, divers composés phénoliques ont une activité anti-*Listeria in vitro*, à 35°C en milieu gélosé, à des concentrations variant entre 500 et 1000 ppm. Aucun de ces agents n'est utilisé à grande échelle dans les aliments (Payne *et al.* 1989 ; Blaszyk et Holley 1998).
- 27 La résistance de *L. monocytogenes* à la plupart des agents physiques ou chimiques augmente considérablement après un traitement d'adaptation à un stress homologue ou hétérologue. Ainsi, selon Lou et Yousef (1997), *L. monocytogenes* survit au peroxyde d'hydrogène à 0,1 % en milieu TSBYE pendant au moins 8 heures à 4°C, après des pré-traitements d'une heure avec de l'H₂O₂ à 0,1 %, un acide à pH 4,5 (HCl), du NaCl à 7 % , de l'éthanol à 5 % ou un choc thermique de 1 heure à 45°C. Ce dernier traitement indépendamment d'une adaptation accrue aux températures supérieures à 60°C, permet aussi à *L. monocytogenes* de survivre au moins 4 heures dans des milieux contenant jusqu'à 17,5 % d'éthanol ou encore 14 jours à +4°C dans une saumure à 25 % de NaCl.
- 28 Les nitrites ont une activité bactériostatique sur *L. monocytogenes* dans des conditions particulières. Ainsi, 100 ppm de nitrites sont inefficaces si le pH initial du milieu est supérieur à pH 7,5 (Buchanan *et al.* 1989),

mais une concentration de 50 ppm est bactériostatique lorsque le pH du milieu de croissance est inférieur à pH 6. De même, l'effet bactériostatique des nitrites s'accroît lorsque la température baisse, lorsque le potentiel rédox du milieu baisse (en anaérobiose), et dans une moindre mesure en présence de NaCl (Buchanan *et al.* 1989 ; Buchanan et Phillips 1990). L'addition d'ascorbate de sodium à la viande salée potentialise l'effet des nitrites (Duffy *et al.* 1994). Les expérimentations sur l'effet des nitrites, antérieures à ces travaux, sont entâchées d'un biais dans la mesure où les auteurs ont utilisé des solutions de nitrite autoclavées, dans lesquelles la molécule est instable (Lou et Youssef 1999).

- Substances antimicrobiennes naturelles produites par les plantes

- 29 Les plantes sont bien connues pour leur activité antimicrobienne. Les agents anti-microbiens sont les phytoalexines, isothiocyanates, allícines, pigments et les composés phénoliques des herbes ou épices. Beuchat et Golden (1989) ont listé 60 plantes qui sont couramment utilisées comme herbes ou épices présentant des activités antimicrobiennes. Les acides, présents dans les plantes, sont utilisés comme conservateurs (acides benzoïque, sorbique, acétique et citrique). Il a été démontré que le romarin inhibait la croissance de *L. monocytogenes* (Pandit et Shelef 1994). Les piments et l'eugénol ont inhibé *L. monocytogenes* et *Aeromonas hydrophila* dans la viande de poulet préparée (Hao *et al.* 1998).

Question n°6 : Quels sont les caractères importants de *L. monocytogenes* qui lui donnent ses potentialités de survie et de croissance dans l'environnement ?

- 30 L'hétérogénéité phénotypique et génotypique de *L. monocytogenes* a été aussi évoquée pour expliquer la colonisation des niches écologiques dans lesquelles survit cette bactérie (Harvey et Gilmour 1994 ; Lawrence et Gilmour 1994).
- 31 Parmi les caractères les plus importants expliquant la survie et la croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments, son aptitude à coloniser de nombreuses niches écologiques est déterminante.
- 32 Les températures permissives de *L. monocytogenes* vont de quelques degrés Celsius en dessous de zéro à 42°C environ. Cette très large gamme de température est un moyen de survie et de développement efficace dans la nature. C'est aussi un caractère important expliquant dans les conditions d'humidité et d'environnement nutritionnel, les colonisations des milieux industriels (90 % des aliments sont réfrigérés avant consommation) et ceci d'autant plus que son aptitude à résister à d'assez fortes concentrations de chlorure de sodium est connue (et utilisée par exemple comme agent sélectif dans certains milieux de culture). Ces deux propriétés qui possèdent un lien physiologique (Ko *et al.* 1994), expliquent sans doute largement d'une part la survie et la croissance de *L. monocytogenes* dans les aliments réfrigérés et salés et d'autre part sa survie dans les environnements de fabrication des aliments. *L. monocytogenes* diffère de la majorité des bactéries, et se distingue de toutes les bactéries pathogènes pour l'homme et l'animal, par cette possibilité de croissance étendue sur environ 45°C (Rosso *et al.* 1993).
- 33 Les exigences nutritives modérées permettent aussi une croissance en conditions très défavorables. L'aéroanaérobiose et la microaérophilie de *L. monocytogenes* interviennent dans le caractère adaptatif marqué de l'espèce.
- 34 La multiplicité des sources de fer est sans doute aussi un facteur de la large adaptation aux environnements divers, de la terre aux végétaux et aux animaux.

Question n°7 : Que sait-on des interactions entre *L. monocytogenes* et les autres microorganismes ?

- 35 De très nombreuses interactions antagonistes de *L. monocytogenes* ont été décrites *in vitro* ou encore dans des produits laitiers et carnés à l'échelle du laboratoire. La plupart font appel à l'action de bactériocines produites par des ferments lactiques ou par des ferments d'aromatation (Eppert *et al.* 1997 ; Moll *et al.* 1999). Parmi les bactériocines, la nisine, est la plus anciennement connue et son efficacité prouvée dans des fromages (Richard 1996). De nombreuses autres bactériocines ont été décrites depuis 20 ans : lacticine, helveticine, sakacine, divercine, piscicocine, pediocine, carnicine, linenscine (Siswanto *et al.* 1996 ; Moll *et al.* 1999). Toutes ou presque sont efficaces *in vitro* ou dans des fabrications expérimentales à l'échelle du laboratoire (Maisnier-Patin *et al.* 1992 ; Ennahar *et al.* 1996 ; Ross *et al.* 1999). Il semble que quelle que soit la bactériocine considérée, des résistances croisées aux bactériocines puissent apparaître rapidement (Song et Richard 1997). D'autres travaux existent et montrent qu'il n'y a pas d'apparition de résistance croisée lorsque les bactériocines considérées sont de classes différentes (Rasch and Knochel, 1998 ; Schillinger *et al.* 1998). Par ailleurs différentes observations d'industriels laitiers vont en ce sens mais n'ont pas été publiées.

- 36 Indépendamment des bactériocines, des phénomènes de compétition ont été décrits, où intervient l'effet inhibiteur propre d'acides organiques issus de la fermentation des sucres ou du pH final des produits (Gouet *et al.* 1978 ; Schaak et Marth 1988 ; Breidt *et al.* 1998). Certaines espèces de staphylocoques, en particulier *Staphylococcus sciuri*, semblent freiner la colonisation des surfaces par *Listeria* sous forme de biofilms (Leriche-Sibille et Carpentier 1999 ; Leriche et Carpentier 2000) ; ces effets auraient pour origine la production par ces bactéries de surfactants inhibant partiellement l'adhésion de *L. monocytogenes* à la surface des environnements de fabrication. Un effet inhibiteur de *L. innocua* sur *L. monocytogenes* est lié à une production de bactériocine, ou plus vraisemblablement des particules phagiques (Kalmokoff *et al.* 1999 ; Yokoyama *et al.* 1998).
- 37 Récemment, il a été fait état de l'existence de molécules à activité anti *Listeria* produite par *Geotrichum candidum* en milieu liquide et solide. L'inhibition exercée par cette moisissure semble liée à la production de précurseurs de la phénylalanine et du tryptophane très stables à la chaleur (120°C, 20 min) (Dieuleveux *et al.* 1998).

SECTION B : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE *L. MONOCYTOGENES*

Question n°8 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement de *L. monocytogenes* en microbiologie des aliments ?

- Méthodes de détection

- 38 Les méthodes développées ces dernières années pour la détection et l'isolement des *Listeria* doivent prendre en compte la complexité des différentes matrices alimentaires associées à la présence éventuelle d'un faible nombre de *Listeria* parmi une flore microbienne associée parfois très importante dans ces aliments.
- 39 Cela a entraîné la mise au point d'un certain nombre de milieux d'enrichissement et d'isolement sélectifs ainsi que la recherche de milieux permettant la revivification de bactéries stressées tout en essayant de raccourcir la durée d'analyse, facteur essentiel lors de la recherche de *L. monocytogenes* dans des aliments incriminés lors d'épidémie ou plus fréquemment lors des autocontrôles en production agro-alimentaire.
- 40 À partir de tous ces impératifs, l'évolution des méthodes de recherche de *L. monocytogenes* a été très rapide. En 1986, cette recherche nécessitait 2 à 3 semaines, elle peut se faire aujourd'hui, sans difficultés majeures, à l'aide d'une méthode normalisée et reconnue Norme Française (NF), Norme Européenne (EN) et Norme Internationale (ISO) en 4 à 5 jours. C'est une méthode lourde, en plusieurs étapes, avec enrichissement primaire et secondaire en bouillon de Fraser et isolements sur milieux sélectifs, PALCAM et Oxford, après chaque étape d'enrichissement.
- 41 La méthode AFNOR (Association Française de NORmalisation) de routine pour la détection de *L. monocytogenes* correspond à la norme NF V 08 055 (**Tableau IV**).

Tableau IV Méthodes de mise en évidence des *L. monocytogenes* : méthodes normalisées et méthodes validées de détection et de dénombrement (au 01/07/00).

Méthodes normalisées		
De référence	NF/EN ISO 11290-1	Détection
	NF/EN ISO 11290-2	Dénombrement
De routine	NF V08 055	Détection
Méthodes validées AFNOR (producteur) (date(s) de validation) *		
Culture	RAPID L. MONO™ (BIORAD- PASTEUR) (15/09/98)	Détection
Test immunoenzymatique	LISTERIA RAPID TEST™ LISTERIA Sp. (OXOID) (11/04/95-11/04/99)	Détection
	VIDAS™ LISTERIA (BIOMERIEUX) (17/06/94-09/06/98)	Détection
	VIDAS™ L. MONOCYTOGENES (BIOMERIEUX) (26/03/96)	Détection
	KIT TRANSIA (DIFFCHAMP) (21/11/95-11/02/00)	Détection
Hybridation des acides nucléiques	GENETRAK™ L. MONOCYTOGENES (DIFFCHAMP) (07/02/95-18/01/99)	Détection
	ACCUPROBE™ L. MONOCYTOGENES (BIOMERIEUX) (07/02/95-18/01/99)	Détection
Amplification génique	PROBELIA™ L. MONOCYTOGENES (BIORAD- PASTEUR) (21/01/98)	Détection

* Il est à noter que la validation AFNOR d'une méthode alternative est donnée pour 4 ans et doit être suivie d'une étude de reconduction pour être effective

- 42 Les méthodes de référence sont issues d'un accord au niveau international et européen. Elles sont utilisées principalement dans le cadre d'échanges internationaux et de litiges. Les méthodes normalisées de routine sont définies uniquement au niveau français ; elles sont simplifiées par rapport aux méthodes de référence et sont utilisées en particulier dans le cas d'analyses de routine quotidiennes.
- 43 La nécessité d'une réponse rapide, a entraîné le développement d'un grand nombre de méthodes commerciales. Bien que reposant sur des principes différents, elles nécessitent toutes au minimum une phase d'enrichissement sélectif avant l'application d'un test de type immunoenzymatique, d'un test d'hybridation des acides nucléiques ou d'une d'amplification génique (« Polymerase Chain Reaction » : PCR). Certaines méthodes rapides utilisent une étape d'immunocapture à l'aide d'un support recouvert d'anticorps spécifiques du genre *Listeria* ou de l'espèce *monocytogenes*. Ces méthodes permettent de faire un tri rapide dans un délai de 2 à 3 jours entre les échantillons mesurés positifs et les négatifs. Cependant,

il est nécessaire de confirmer un résultat positif par isolement sur milieu sélectif et de procéder à l'identification des colonies présentes.

- 44 Certaines de ces méthodes (**Tableau IV**) ont été validées par le Bureau Technique de Validation AFNOR des méthodes alternatives, au terme d'une étude complète comprenant une étude préliminaire et des essais inter-laboratoires : l'étude préliminaire permet de déterminer la justesse de la méthode commerciale par rapport à une méthode de référence, sa limite de détection et sa spécificité ; les essais interlaboratoires permettent de déterminer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode commerciale. Les essais sont menés par un laboratoire expert. Toutes les règles de fonctionnement de cette validation sont fixées par la Commission de validation des méthodes alternatives au sein de l'AFNOR.
- 45 Ces études de validation ont montré que, malgré la bonne concordance statistique des résultats entre une méthode alternative et la méthode normalisée, certains résultats discordants pouvaient apparaître.
- 46 Au plan européen, un système de validation des méthodes alternatives se met en place et fait suite au projet « Microval », fondé en partie sur la méthodologie de validation AFNOR. Les règles de la validation européenne ont été fixées par le Comité Général de Microval et sont disponibles dans le document « Microval Rules and Certification Scheme - Version 2 - Mai 1999 ».
- 47 Par ailleurs, une étude européenne de la méthode EN ISO 11290-1 a été menée dans 19 laboratoires de 14 pays différents, de façon à mesurer les performances de la méthode normalisée et notamment la précision. Chacun des laboratoires a analysé 3 types de matrices artificiellement contaminées à 3 niveaux (de 5 à 100 Unités Formant Colonies (UFC)/25g). Globalement, les résultats ont montré que la méthode présentait une sensibilité de 85,2 % et une spécificité de 97,4 %. Il n'a pas été montré de différences dans les performances des deux milieux sélectifs employés, Oxford et PALCAM. De plus des faux négatifs ont été obtenus lorsque les catégories d'aliments analysés contenaient des forts taux de *L. innocua*. Ainsi, il a été démontré que durant les étapes d'enrichissement, *L. innocua* devenait la population dominante et pouvait masquer la présence de *L. monocytogenes* après isolement sur milieu sélectif. Dans la plupart des cas, *L. monocytogenes* n'a pas été détectée au stade du premier enrichissement mais seulement après un deuxième enrichissement.
- 48 De faibles quantités de *L. innocua* peuvent masquer la présence de *L. monocytogenes* à l'issue de la procédure d'enrichissement (Petran et Swanson 1993 ; Curiale et Lewus 1994 ; McDonald et Sutherland 1994). *L. innocua* aurait un « avantage sélectif » sur *L. monocytogenes* par une croissance plus rapide en bouillons sélectifs (de type Fraser) ce qui conduit à des rapports de concentration *L. monocytogenes* / *L. innocua* très faibles. D'après Beumer *et al.* (1996), cette différence serait due à l'acriflavine, à laquelle *L. monocytogenes* serait plus sensible que *L. innocua*. D'autres auteurs suggèrent que l'avantage en faveur de *L. innocua* au cours de la procédure d'enrichissement pourrait être dû à une inhibition de *L. monocytogenes* par *L. innocua* (Yokoyama *et al.* 1998). En effet, un effet inhibiteur de *L. innocua* a été bien démontré contre *L. monocytogenes* (Yokoyama *et al.* 1998 ; Kalmokoff *et al.* 1999), le mécanisme en serait une production de bactériocine, ou plus vraisemblablement des particules phagiques. On peut supposer que cette action s'exprime de façon plus forte dans un milieu liquide d'enrichissement (libre diffusion des particules) qu'*in situ* dans l'aliment solide.

• Méthodes d'isolement

- 49 Quelle que soit la méthode normalisée, l'isolement des colonies se fait sur des milieux sélectifs : gélose Oxford et/ou PALCAM.
- 50 Ces géloses de type PALCAM ou Oxford ne permettent pas de différencier les différentes espèces de *Listeria*, or la méthode normalisée demande le repiquage de cinq colonies par boîte d'isolement pour procéder à l'identification de l'espèce. Le risque de faux-négatifs augmente avec la proportion de *L. innocua* présente dans le milieu.
- 51 Des nouveaux milieux de culture différentiels permettent aujourd'hui la distinction de *L. monocytogenes*. L'un d'entre eux, le Rapid L.mono™, a été validé par la commission AFNOR. Il est fondé sur la présence de l'activité Phosphatidyl Inositol Phospholipase C obtenue avec *L. monocytogenes* mais aussi avec *L. ivanovii*. La différenciation se fait ensuite à l'aide d'un caractère biochimique négatif pour *L. monocytogenes*.
- 52 D'autres milieux spécifiques sont commercialisés dont le milieu ALOA et le milieu LBA. Des essais comparatifs de ces milieux sont en cours.
- 53 La confirmation de l'appartenance au genre *Listeria* se fait à partir des colonies ayant un aspect caractéristique sur les milieux d'isolement sélectif par la mise en évidence de la catalase, la vérification de la mobilité au microscope à partir d'un bouillon incubé à 25°C ou en gélose mobilité.

• Méthode de dénombrement

- 54 La méthode de dénombrement de *L. monocytogenes* est décrite dans la norme EN ISO 11290-2 publiée en 1998. Elle a fait l'objet d'essais inter-laboratoires dans le cadre d'un projet européen (SMT4 CT 96 2098) coordonné par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (Scotter 1999a, b).
- 55 Cette étude avait pour objet d'introduire des paramètres de fidélité (répétabilité et reproductibilité) dans la norme. Y ont participé 21 laboratoires de 16 pays européens. Les essais ont été réalisés à partir d'échantillons de fromage, de viande, de poudre d'œuf, et complétés par l'analyse de matériaux de référence.
- 56 Les 3 types d'échantillons étaient contaminés par des taux déterminés de *L. monocytogenes* auxquels étaient ajoutés des niveaux standardisés de *L. innocua*. De plus les échantillons contenaient une flore autochtone naturelle ou simulée.
- 57 Le niveau bas de contamination était de $2,5 \times 10^2$ *L. monocytogenes*/g. Le niveau moyen de $2,5 \times 10^3$ *L. monocytogenes*/g, et le niveau élevé de $2,5 \times 10^4$ *L. monocytogenes*/g. Dans chaque échantillon était ajoutée une quantité égale de *L. innocua* et une flore autochtone naturelle ou simulée. Ainsi les échantillons témoins contenaient seulement *L. innocua* à un taux de $2,5 \times 10^2$ /g et une flore autochtone. Pour chaque type d'aliment, et chaque laboratoire, 8 échantillons ont été examinés, soit 2 échantillons pour chacune des 4 dilutions.
- 58 D'une façon générale, la fidélité de la méthode EN ISO 11290-2 est acceptable quel que soit le type d'aliment ; la valeur générale de répétabilité est de 0,58 exprimée en échelle logarithmique et celle de reproductibilité est de 0,81. Cependant dans plusieurs cas la fidélité était mauvaise, à la fois pour les échantillons de viande et d'œufs. De fait, quand *L. innocua* se trouve en mélange avec *L. monocytogenes*, il est difficile, dans les conditions habituelles de laboratoire et compte tenu des géloses d'isolement (Oxford et PALCAM) préconisées dans la méthode normalisée, de confirmer la présence et surtout la proportion de colonies de *L. monocytogenes* présentes sur les boîtes. Sur la base de ces résultats, il a été décidé d'incorporer les données de fidélité comme un amendement à la norme EN ISO 11290-2.
- 59 Par ailleurs, tout dénombrement est soumis aux classiques fluctuations d'échantillonnage, dont l'importance relative est très sensible pour les faibles nombres : le coefficient de variation (CV) est de $(\sqrt{N}/N) + \varepsilon$ avec N , le nombre de colonies présentes sur la boîte ou l'ensemble des boîtes et ε , l'erreur de dilution. Un prélèvement donnant 100 colonies sur une boîte est donc connu avec un CV de 11 % et un prélèvement donnant 10 colonies avec un CV 33 % (Rosso 1995). Un même prélèvement pourra donc être supérieur ou inférieur au seuil choisi, lors de prélèvements itératifs, du fait de ces problèmes statistiques.
- 60 D'autres paramètres doivent entrer en ligne de compte pour l'interprétation finale d'un résultat de détection ou dénombrement, notamment des facteurs relatifs au prélèvement : échantillonnage et prise d'essai, et d'autres facteurs relatifs à l'état du microorganisme dans l'aliment : stress, altérations, traitements physico-chimiques et thermiques.

• Échantillonnage

- 61 L'hétérogénéité des produits analysés tant au sein d'une unité consommable qu'au sein d'un lot de fabrication doit être prise en compte et ceci d'autant plus lorsque le taux de contamination est faible : un lot de produits de la même fabrication n'est pas homogène (dans un même lot, certains produits peuvent être contaminés, d'autres non) et un produit peut ne pas être contaminé de façon homogène (le niveau de contamination peut varier selon la face du produit, la profondeur, par exemple). Ceci implique que, dans un lot considéré comme homogène, un échantillon pourra contenir ou ne pas contenir *L. monocytogenes*. Dans un échantillon, un prélèvement d'un volume donné pourra contenir ou ne pas contenir la bactérie (c'est le phénomène classique des fluctuations d'échantillonnage). Cette double incertitude complique l'interprétation finale. Cela justifie le choix d'un plan d'échantillonnage adapté, dont la sévérité doit découler de l'homogénéité de la contamination, du nombre d'unités défectueuses que l'on considère comme acceptable dans le lot, en fonction de la signification en terme de santé publique de la présence de *L. monocytogenes* dans l'aliment considéré. Déceler une proportion de défectueux de 0,1 % dans un lot avec 95 % de chance de réussite nécessite l'analyse de 2000 unités consommables. Avec un échantillonnage moins important, un résultat négatif n'a que la valeur du plan d'échantillonnage correspondant. Un résultat positif signe par contre la présence de *L. monocytogenes*. Pour tenter de pallier ces aléas, des protocoles d'échantillonnage précis ont été décrits pour chaque catégorie de produits, ainsi que les modalités pour effectuer les prises d'essai (ICMSF 1994).

- Influence du stress et des altérations

- 62 Le stress bactérien peut être défini comme toute variation des paramètres physico-chimiques de l'environnement des micro-organismes capable d'affecter leur survie à court et à long terme.
- 63 On connaît l'existence de souches de *L. monocytogenes* stressées, altérées par les traitements qu'elles ont subis (thermisation, congélation, salage) et qui deviennent sensibles à certains inhibiteurs utilisés dans les milieux sélectifs. Ces souches peuvent, dans ces conditions, parfois ne plus cultiver sur gélose PALCAM mais continuer à le faire sur gélose Oxford moins inhibitrice mais moins sélective et laissant cultiver des micro-organismes susceptibles de masquer la présence de *Listeria* (Sörqvist 1993). C'est pourquoi la méthode normalisée NF EN ISO 11290-1 demande d'effectuer l'isolement sur les deux milieux gélosés Oxford et PALCAM. De plus, le comportement des souches stressées de *L. monocytogenes* pourrait encore amplifier le phénomène de culture majoritaire de *L. innocua*.
- 64 L'état physiologique des bactéries recherchées conditionne largement le succès ou l'échec de la détection ou l'exactitude du dénombrement. Ce point est encore mal connu et devra être pris en compte lors de l'établissement des critères réglementaires.

Question n°9 : Quelles sont les méthodes utilisées actuellement pour l'isolement et le dénombrement de *L. monocytogenes* en médecine humaine et vétérinaire ?

- En médecine vétérinaire (Lucas *et al.* 1955 ; Audurier *et al.* 1977 ; Berche *et al.* 1989 ; Holt *et al.* 1994)
 - 65 Les prélèvements sont essentiellement des avortons, placenta, système nerveux central (encéphale, cervelet, bulbe), cœur, foie, rate, en fonction des symptômes observés sur les animaux, des espèces et des lésions découvertes à l'autopsie. Le sang et le liquide céphalo-rachidien sont peu prélevés.
 - 66 La culture se fait à partir de prélèvements (effectués après cautérisation en surface) de l'organe à analyser. L'ensemencement s'effectue, après broyage, sur des milieux liquides (bouillon-sérum par exemple) puis sur des géloses au sang soit de mouton ou de cheval (5 %) à 37°C en atmosphère aérobie ou sous atmosphère CO₂ (5 à 10 %). On peut aussi utiliser des milieux spécifiques ou des milieux sélectifs, exemple : gélose ANC, un milieu gélosé au sang (mouton ou cheval) contenant des inhibiteurs de la flore à Gram négatif (acide nalidixique, colistine) convient.
 - 67 Certains caractères bactériologiques permettent de le différencier d'un autre germe tellurique à Gram positif également présent en pathologie vétérinaire comme *Erysipelothrix rhusiopathiae*.
 - 68 Des tests complémentaires seront faits pour confirmation et différenciations des différents types de souches.
- En médecine humaine (Murray *et al.* 1995 ; Flandrois et Chomarat 1998 ; Anonymous 1998b)
 - 69 Les prélèvements concernent le sang et le liquide céphalo-rachidien (LCR). La culture du sang sur des milieux pour hémoculture ne présente aucune difficulté, que l'hémoculture soit ou non automatisée. La culture apparaît positive en 24 à 48 heures. La culture à partir du liquide céphalo-rachidien s'effectue sur des milieux liquides comme le bouillon cœur-cerveille ou gélosés au sang (mouton ou cheval). Les subcultures sont obtenues sans difficulté sur milieux gélosés au sang (mouton ou cheval). *L. monocytogenes* peut aussi être recherchée dans les sécrétions vaginales, le placenta ou le méconium. Sur les milieux gélosés au sang, l'hémolyse peut être absente (sang de mouton) ou faible. On distingue les colonies de celles des entérocoques qui ont un aspect identique par la mise en évidence d'une activité catalasique forte. L'identification s'appuie sur divers caractères de base et sur l'hydrolyse en moins d'une à deux heures de l'esculine. Des tests complémentaires seront faits pour confirmation.
- Identification de l'espèce *L. monocytogenes* (Jones et Seeliger 1995) (cf. paragraphes 5 et 6)
 - 70 Ceci s'effectue par la recherche de l'hémolyse sur gélose au sang de mouton ou sur une suspension d'hématies. Le test de CAMP s'effectue sur gélose au sang de mouton sur laquelle sont ensemencées, de part et d'autre, une culture de *S. aureus* et une autre de *R. equi*, l'ensemencement de la souche d'essai se fait de façon perpendiculaire aux cultures de *S. aureus* et *R. equi*.
 - 71 Une réaction positive avec *S. aureus* est visualisée par une petite zone d'hémolyse à l'intersection de la souche. La réaction positive avec *R. equi* correspond à une large zone d'hémolyse. Un test fondé sur la production d'acides à partir du rhamnose et du xylose permet de compléter l'identification.
 - 72 L'espèce *L. monocytogenes* présente le plus souvent les caractères suivants : hémolyse positive, test de CAMP positif avec *S. aureus* et négatif avec *R. equi*, production acide positive en présence de rhamnose et négative en présence de xylose. Il existe également des galeries miniaturisées d'identification d'espèce.

• Caractérisation des souches

- 73 Différents types de méthodes sont aujourd'hui disponibles pour différencier les souches de *L. monocytogenes*. Certaines sont anciennes mais encore très largement utilisées comme la sérotypie et la lysotypie.
- 74 Le sérotypage, fondé sur la mise en évidence d'antigènes somatiques flagellaires, permet de diviser l'espèce en 13 sérovars (Seeliger et Höhne 1979) : 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e et 7. Cette caractérisation est internationalement utilisée et reconnue. Bien que son pouvoir discriminant soit faible, le sérotypage est une première approche indispensable dans la différenciation de l'espèce.
- 75 la lysotypie est fondée sur la sensibilité aux bactériophages et permet de subdiviser les souches d'un même sérovar (Audurier *et al.* 1977 ; Rocourt *et al.* 1985).
- 76 Les méthodes plus récentes reposent sur la caractérisation du génome et s'appliquent à de nombreuses espèces bactériennes ; elles ont été particulièrement bien développées et rapidement appliquées à *L. monocytogenes* en raison de l'importance du problème épidémiologique posé par la listériose.
- 77 L'analyse du polymorphisme électrophorétique des enzymes (ou « Multilocus Enzyme Electrophoresis » : MEE) permet de différencier les isolats selon la mobilité électrophorétique d'un certain nombre d'enzymes métaboliques. Cette analyse a été appliquée dès 1989 à *L. monocytogenes* (Piffaretti *et al.* 1989 ; Bibb *et al.* 1990).
- 78 L'analyse des profils de restriction de l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) chromosomique total (ou « Restriction Enzyme Analysis » : REA) permet une discrimination assez bonne, cependant les profils d'ADN demeurent difficiles à analyser du fait d'un grand nombre de fragments générés. Ceci a été partiellement résolu dans la technique « Restriction Fragment Length Polymorphism Pattern » (RFLP) qui consiste à analyser le polymorphisme électrophorétique de certains gènes chromosomiques à partir d'une électrophorèse d'ADN total couplé à un transfert et une hybridation avec certains fragments d'ADN. La discrimination apportée par cette technique est intéressante pour les souches de sérogroupe 1, mais plus limitée avec les souches du sérovar 4.
- 79 Le ribotypage est une technique fondée sur le même principe. La sonde utilisée étant une séquence d'ADN s'hybridant avec les gènes codant pour l'ARN (Acide RiboNucléique) ribosomique. C'est une technique très largement utilisée pour la caractérisation de nombreuses espèces bactériennes (Grimont et Grimont 1986). Son pouvoir discriminant varie en fonction des sérovars, mais son inconvénient majeur est la lourdeur et la longueur de la technique. Depuis peu, une automatisation de la technique a été développée. Ce système, appelé Riboprinter™ (E.I. Dupont) permet une bonne standardisation de la méthode accompagnée d'une base de données de profils et devient accessible à un plus grand nombre de laboratoires. Cependant, le coût total de la technique reste élevé et limite son utilisation aux laboratoires de grande capacité.
- 80 La technique de Détermination du profil de restriction de l'ADN total après électrophorèse en champ pulsé (ou « Pulsed Field Gel Electrophoresis » : PFGE) est fondée sur l'électrophorèse de gros fragments d'ADN généré après l'action d'enzyme de restriction à faible fréquence de coupure. Cette électrophorèse s'effectue selon un procédé particulier qui permet la migration de gros fragments d'ADN. Cette technique a été largement utilisée ces dernières années dans un but épidémiologique (Franciosa *et al.* 1998), pour comparer les souches isolées d'aliments et de celles isolées de patients (Boerlin *et al.* 1997), pour analyser la traçabilité de contaminants microbiens au sein de sites de production industriels (Giovannacci *et al.* 1999). Cette technique paraît reproductible et a été utilisée dans le cadre d'études multicentriques interlaboratoires. D'après Brosch *et al.* (1994), la technique est l'une des plus discriminantes pour le typage de *L. monocytogenes*.
- 81 D'autres méthodes fondées sur l'amplification génique ont été développées. La technique « Random Amplified Polymorphism DNA » (RAPD) (Boerlin *et al.* 1995) est fondée sur l'utilisation d'amorces choisies au hasard. Cette méthode est plus rapide à mettre en œuvre mais manque parfois de reproductibilité.
- 82 Enfin des méthodes se sont développées telles que la « PCR-Ribotyping » ou des techniques de REP-PCR ou ERIC-PCR.
- 83 Plusieurs de ces techniques sont mises en œuvre conjointement lors d'enquête ou d'étude en épidémiologie.

Question n°10 : Quel est l'apport des outils de la biologie moléculaire dans l'isolement et l'identification de *L. monocytogenes* ?

- 84 Des méthodes de détection dans les aliments de *L. monocytogenes* par amplification génique se sont développées ces dernières années. Ces méthodes sont fondées, le plus souvent sur la réaction PCR et présentent une meilleure sensibilité par rapport aux méthodes utilisant des sondes nucléiques (hybridation)

ou des anticorps (immuno-essais). Néanmoins la PCR nécessite certaines précautions de manipulation dans sa réalisation et un agencement de laboratoire adapté.

- 85 L'introduction des kits commercialisés utilisant la PCR a facilité l'utilisation en routine de cette méthode. Le principe est identique quelle que soit la méthode. Il repose sur l'amplification par PCR d'une séquence nucléique spécifique de *L. monocytogenes*. Les séquences amplifiées sont variables, elles sont souvent dérivées des gènes de virulence spécifiques à *L. monocytogenes* telle celle de la listériolysine (*hlyA*), de la protéine d'invasion (*iap*), de la phospholipase B (*plcB*). D'autres séquences spécifiques de *L. monocytogenes* peuvent servir de cible pour la PCR. La révélation des amplicons peut se faire de différentes façons. Dans le test Probelia™ (Biorad), les produits amplifiés sont détectés par hybridation sandwich sur microplaque à l'aide de sonde spécifique de la séquence du gène *hlyA* codant pour la listériolysine O. Dans ce cas, l'hybridation et le lavage sont réalisés à l'aide d'un agitateur-incubateur de microplaques et d'un laveur de microplaques. Une mesure de densité optique est ensuite réalisée.
- 86 Les produits d'amplification obtenus par la méthode BAX™ (Qualicon) sont révélés sous lumière ultraviolet après migration électrophorétique dans un gel contenant du bromure d'éthidium. Dans cette dernière méthode, la mise en œuvre de la PCR est largement facilitée par la présentation de l'ensemble des réactifs sous forme de comprimés déshydratés dans chacun des microtubes, ceci permettant de réduire les manipulations et risque de contamination.
- 87 Ces méthodes commercialisées en France nécessitent la réalisation d'un pré-enrichissement de 18-24 h avant la réalisation de la PCR. Par conséquent, elles permettent d'obtenir un résultat le lendemain du jour de l'analyse. Cependant, comme pour toute méthode alternative, il peut apparaître des résultats positifs par excès (« faux positifs ») qui pourraient être dus en partie à la détection de bactéries mortes ; mais cela est résolu par la mise en œuvre du premier enrichissement et par la limite de détection de la méthode à environ 10^3 UFC/ml. Des résultats négatifs par excès (« faux négatifs ») dus à l'inhibition de la PCR peuvent aussi apparaître. Ce phénomène d'inhibition par certaines matrices alimentaires n'est pas toujours résolu par un traitement ou un protocole particulier pour les aliments connus pour être inhibiteur ou par la mise en place d'un contrôle interne pour chaque échantillon analysé.
- 88 Plus récemment, se sont développées des méthodes dites « PCR semi-quantitative » permettant de connaître le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. Ces méthodes utilisent, en plus de la PCR classique, l'activité 5'nucléasique de la Taq polymérase. Celle-ci va être révélée à l'aide d'une sonde interne couplée à un fluorochrome. Cette sonde interne porte à la fois un « Reporter » et un « Quencher » qui, lorsqu'il est associé au « Reporter », inhibe son activité de fluorescence. L'activité de la Taq DNA polymérase va libérer le Reporter qui, dans le milieu, va pouvoir exprimer l'activité de fluorescence, en nombre proportionnel au nombre de cibles présent dans le milieu. Des essais ont été effectués en utilisant une sonde ayant pour cible l'hémolysine (*hlyA*). L'optimisation de la méthode a permis de détecter 50 UFC. La réaction est linéaire et peut dénombrer entre 50 et 5×10^5 UFC (Bassler *et al.* 1995).
- 89 D'autres méthodes ont été décrites : ainsi une méthode « PCR emboîtée » avec deux couples d'oligonucléotides pris dans la séquence de listériolysine permet de détecter dans le lait de 5 à 10 UFC dans 25 ml (Herman *et al.* 1995). Très récemment, une méthode fondée sur l'utilisation de « Reverse Transcriptase-PCR » (RT-PCR) des ARNm de l'hémolysine a montré qu'il était possible de mettre en évidence des formes viables de *L. monocytogenes* (Norton et Batt 1999). Enfin il a été décrit une méthode de détection-identification fondée sur l'utilisation du phage A511 capable d'infecter la plupart des souches de *L. monocytogenes* (Loessner *et al.* 1997). L'incorporation de l'opéron *lux* de *Vibrio fischeri* dans son chromosome autorise la détection de *Listeria* en 24 heures à un niveau de sensibilité proche de celui obtenu en 4 jours avec la méthode de référence.

Question n°11 : Les bactéries viables non cultivables sont-elles à prendre en compte d'une certaine façon ?

- 90 L'existence de formes viables mais non cultivables, bien documentée pour différentes bactéries à Gram négatif, n'a pas été rapportée jusqu'ici pour *L. monocytogenes*. Toutefois, de telles formes ont été récemment décrites chez *Enterococcus faecalis*, espèce phylogénétiquement proche de *L. monocytogenes*, ce qui laisse prévoir l'existence possible de ce pathogène dans cet état physiologique particulier au sein des milieux naturels. (Leo *et al.* 1998, Signoretto *et al.* 2000).

SECTION C : ÉCOLOGIE DE *L. MONOCYTOGENES*

Question n°12 : Que sait-on de la présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement ?

- 91 *L. monocytogenes* est communément trouvée dans les sols, l'eau et sur les végétaux, particulièrement ceux en décomposition. Cet environnement est considéré comme l'habitat naturel du germe (Rocourt and Seeliger 1985). La végétation en décomposition est le support du développement d'un nombre important de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* peut survivre longtemps dans des conditions d'environnement défavorables (Fenlon 1999).
- 92 Le sol est souvent considéré comme la source de contamination, particulièrement les sols agricoles fertiles qui reçoivent du matériel végétal en décomposition, des déjections animales et des épandages. L'étude de Weiss et Seeliger (1975) en Allemagne, montre que *L. monocytogenes* est présente dans de multiples échantillons de plantes : champs de blé, de maïs (prévalence : 9,7 %), de céréales (13,3 %), de cultures maraîchères (12,5 %), jachères (44 %), prairies et pâtures (15,5 %), forêts (21,3 %) et zones de fréquentation d'animaux sauvages (23,1 %). La survie de *L. monocytogenes* dépend de la nature du sol et de son degré d'humidité (Welshimer 1960). Watkins et Sleath (1981) démontrent que, dans les sols de près sur lesquels ont été faits des épandages, la teneur en *Listeria spp.* décroît en huit semaines.
- 93 *L. monocytogenes* est retrouvée dans les excréments d'un grand nombre d'espèces d'animaux en bonne santé. Gray et Killinger (1966) citent 37 espèces de mammifères pour lesquelles le germe a été isolé à partir de leurs excréments. *L. monocytogenes* est isolé principalement d'excréments d'herbivores (moutons, chèvres et bovins ; Seeliger 1961 ; Gronstol 1979 ; Low *et al.* 1995) mais également de porcs (Dutta et Malik 1981), de volailles et autres oiseaux (poussins, dindons, faisans, mouettes, freux, corbeaux, pigeons ; Gray 1958b ; Nagi et Verma 1967 ; Fenlon 1985 ; Plagemann et Weber 1988), de chevaux (Welsh 1983), de chiens et de chats (Nilsson et Karlsson 1959 ; Sturgess 1989 ; Weber *et al.* 1993). L'excrétion fécale est souvent fonction du type d'élevage et de l'alimentation (Nicolas *et al.* 1988 ; Husu 1990 ; Low *et al.* 1995 ; Fenlon *et al.* 1996). Le germe est retrouvé dans les épandages et les effluents. Des études effectuées par Watkins et Sleath (1981), Geuenich et Muller (1984), Al-Ghazali et Al-Azawi (1988) montrent que des taux élevés peuvent être retrouvés, de 700 à 18 000 CFU/l ou 10^3 à 10^5 CFU/ml de *Listeria spp.*, et peuvent décroître en fonction des traitements et des expositions. L'eau de lacs, de rivières, et de ruisseaux peuvent de ce fait être contaminée dans des proportions non négligeables (Dijkstra 1982 ; Frances *et al.* 1991 ; Fenlon *et al.* 1996).
- 94 De nombreuses observations (Welshimer 1968 ; Welshimer et Donker-Voet 1971) montrent la très large contamination des végétaux que ce soient les pâturages par le biais des épandages ou des déjections animales, les fourrages, les légumes (salades) voire les fruits (fraises). L'influence des facteurs favorisants est par contre encore mal connue : la fertilisation organique (fumier, compost, lisier, boues de station d'épuration) joue sans doute un rôle important. La source de contamination de produits végétaux par *L. monocytogenes* a, dans quelque cas, été identifiée par une étude épidémiologique ; ainsi lors de l'épidémie de 1981 au Canada, il a été fortement soupçonné que le chou ayant servi à fabriquer le « coleslaw » avait été contaminé par l'épandage de fumier lors de sa production (Schlech *et al.* 1983). De même l'épandage de boues contaminées a conduit à la présence de *L. monocytogenes* sur une culture d'alfalfa à la récolte (Al-Ghazali et Al-Azawi 1990). *L. monocytogenes* semble par ailleurs survivre plusieurs semaines dans des sols sur lesquels ont été épandues des boues naturellement contaminées : la présence de *L. monocytogenes* dans des eaux usées et dans des boues de station d'épuration non hygiénisées a été mise en évidence par quelques études (Geuenich et Muller 1984 ; Dijkstra 1989 ; Schwartzbrod *et al.* 1989 ; Bernagozzi *et al.* 1994 ; Nguyen-Thé et Carlin 1994).
- 95 Cependant *L. monocytogenes* peut aussi être présente sur des pâturages et sur des végétaux non cultivés ; sa dissémination par des animaux sauvages a alors été mise en évidence (Nguyen-Thé et Carlin 2000). Ainsi, il semble que *L. monocytogenes* fasse partie de l'écosystème tellurique et que son incidence dans l'environnement soit importante (Skovgaard 1990).
- 96 La fréquence de contamination de légumes non transformés est de l'ordre de 2 à 10 % dans la plupart des enquêtes réalisées dans les pays occidentaux (Steingruegge *et al.* 1988 ; Breer et Schopfer 1989 ; Heisick *et al.* 1989 ; McLauchlin et Gilbert 1990 ; Velani et Roberts 1991 ; De Simon *et al.* 1992 ; McGowan *et al.* 1994). Une enquête, aux USA, rapporte des fréquences nettement plus élevées, de 25 à 30 %, sur des pommes de terre et des radis (Heisick *et al.* 1989), mais d'autre l'absence d'échantillons positifs (*i.e.* absence dans 25g) (Farber *et al.* 1989 ; Tiwari et Aldenrath, 1990 ; Gras *et al.* 1994). Une enquête en Malaisie fait état de fréquence plus élevée (Arumugaswamy *et al.* 1994). Il faut cependant noter qu'aucune de ces enquêtes ne décrit précisément l'origine des légumes analysés et leurs conditions de production.

Deux études françaises sur les germes de soja font état respectivement de 3 % et de 19 % d'échantillons positifs (Michard *et al.* 1993 ; Pierre et Veit 1996).

Question n°13 : Que sait-on de l'écologie de *L. monocytogenes* dans les ensilages ?

- 97 Depuis une trentaine d'années l'utilisation des ensilages a pris peu à peu une place prépondérante dans l'alimentation des ruminants, suivant les types et les techniques d'élevage. Ils sont utilisés dans des exploitations d'animaux à production laitière ou de viande (bovins, ovins) ; ils sont fabriqués à partir de coupes d'herbe (« ray-grass », par exemple), de légumineuses, ou de céréales, mais ce sont ceux constitués à base de maïs (qui peut être récolté à des stades très divers de végétation), qui sont les plus employés (Wolter 1971).
- 98 Les végétaux, une fois coupés, doivent être finement hachés, puis stockés dans un silo, placés et maintenus en anaérobiose stricte grâce à de fortes bâches en matière plastique qui rendent étanche le silo. L'ensilage subit alors une fermentation lactique qui va abaisser rapidement le pH jusqu'à pH 3, interdisant toute autre fermentation et toute activité microbienne ; ainsi, les microorganismes présents sur les végétaux, au moment de la coupe, (*Listeria* entre autres : Welshimer 1968 ; Seeliger 1971 ; Weis et Seeliger 1975) disparaîtront rapidement si la fabrication est correcte (pH compris entre pH 3 et pH 4).
- 99 Les ensilages sont connus depuis longtemps pour jouer un rôle important dans l'apparition de la listériose dans des troupeaux de ruminants alimentés de cette façon (Olson *et al.* 1953 ; Gray 1960 ; Charton *et al.* 1962 ; Kruger 1963 ; Nicolas *et al.* 1972, 1974 ; Nicolas 1983). Cette affection a été rapidement appelée la « maladie de l'ensilage » (Goret et Joubert 1976 ; Wilesmith and Gitter 1986), pour laquelle de nombreux facteurs semblent intervenir entre autres le type de silos, la qualité de fabrication de l'ensilage et les conditions de stockage.
- 100 S'agissant du type de silos : le sol étant le réservoir initial de *Listeria*, si l'ensilage est en contact direct avec la terre ou que cette dernière se retrouve à l'intérieur de la masse végétale, la contamination par les *Listeria* risque d'être importante (cas des silos « taupes » non bétonnés rencontrés dans certaines régions) ;
- 101 Pour la qualité de fabrication de l'ensilage : un ensilage bien fait aura rapidement un pH compris entre pH 3 et pH 4 empêchant la multiplication bactérienne et pouvant même favoriser l'élimination de bactéries préexistantes dont *Listeria*. Par contre, si l'ensilage a un pH supérieur à pH 4, il peut y avoir survie de *Listeria* et même multiplication de ces bactéries (Cottureau 1972 ; Gronstol 1979 ; Fensterbank *et al.* 1984 ; Low et Renton 1985 ; Fenlon 1986 ; Gitter *et al.* 1986 ; Nicolas *et al.* 1988 ; Sanaa 1994 ; Johnson *et al.* 1996 ; Stahl *et al.* 1996) ;
- 102 Enfin, un ensilage peut avoir été bien préparé mais maintenu dans de mauvaises conditions d'anaérobiose, du fait, par exemple, de l'emploi de bâches de mauvaise qualité, de récupération, percées ou mal installées à la surface de l'ensilage. Dans ces conditions, la fermentation lactique ne sera pas suffisante dans certaines zones (dessus du silo et côtés pouvant être en contact avec l'air ou la terre), et le pH augmentera, permettant la multiplication bactérienne (Fenlon 1986 ; Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996). Ainsi des taux de *Listeria* très élevés pourront être atteints, entre 10^2 UFC/g et 10^6 UFC/g (Stahl *et al.* 1996). Des études effectuées sur des échantillons d'ensilage prélevés à différents pH montrent une élévation progressive des échantillons contaminés : de 17 % à un pH voisin de pH 4 à 72 % un pH supérieur à pH 6 (Stahl *et al.* 1996).
- 103 Les animaux sauvages (micro-mammifères, oiseaux) peuvent être porteurs de *Listeria* dont *L. monocytogenes*. Ils peuvent contaminer les silos, coloniser les ensilages, percer les bâches et, par conséquent, jouer un rôle dans la multiplication et la dissémination des *Listeria* (Goret et Joubert 1976 ; Fenlon 1985 ; Inoue *et al.* 1992 ; Bind et Delaval 1993 ; Weber *et al.* 1995 ; Stahl *et al.* 1996 ; Bouttefroy *et al.* 1997). Certains auteurs n'hésitent pas à dire que ces vecteurs jouent un rôle très important et que les épidémies de listérioses observées dans certains élevages sont liées à leurs cycles de reproduction. Cette hypothèse serait intéressante à vérifier puisque dans des régions à élevages traditionnels sans ensilage, des foyers sporadiques de listériose surviennent chez des animaux en pâtures naturelles dont le sol est envahi par des campagnols ou des « rats taupiers ».

Question n°14 : Que sait-on de la présence de *L. monocytogenes* dans l'environnement domestique ?

- 104 Peu d'enquêtes sur la contamination des environnements domestiques ont été menées à ce jour. Deux types d'enquêtes distinctes permettent cependant d'estimer d'une part la contamination et d'autre part le risque.
- 105 Les enquêtes systématiques sur la contamination d'environnements domestiques à partir de familles tirées au sort ou choisies indépendamment d'une quelconque épidémie permettent, sur un grand nombre de foyers et avec un protocole de prélèvements identique d'une maison à l'autre, de déterminer assez

précisément des prévalences. Ainsi, quatre enquêtes dans les environnements domestiques ont été identifiées dans la littérature publiée à ce jour. Cox *et al.* (1989) cités par Beumer *et al.* (1996) ont montré que 20 % des environnements domestiques (sur 35 foyers enquêtés), pouvaient être contaminés par *Listeria*. Dans cette enquête, un seul réfrigérateur a permis de mettre en évidence la présence du micro-organisme, alors qu'une autre enquête de Jackson *et al.* (1993) cités par Beumer *et al.* (1996) n'a pas identifié sa présence. Toujours sur les réfrigérateurs, Sergelidis *et al.* (1997) ont identifié 2 prélèvements contaminés par *L. monocytogenes* parmi 261 prélèvements réalisés dans 136 réfrigérateurs. La même enquête menée à la distribution a conduit à l'identification de 1,7 % de vitrines réfrigérées contaminées par *L. monocytogenes*. Notons qu'au cours de cette enquête, réalisée en Grèce, 55 % des réfrigérateurs domestiques et 32 % des vitrines réfrigérées au niveau de la distribution, affichaient des températures supérieures à 9°C. L'enquête la plus exhaustive identifiée à ce jour sur le sujet, est celle de Beumer *et al.* (1996), qui, contrairement aux précédentes, a été menée par isolement direct de *L. monocytogenes* sur un milieu peu sélectif (« enhanced hemolysis agar ») permettant de s'affranchir en partie des compétitions bactériennes, mais ne garantissant pas la revivification de bactéries stressées ; il apparaît dans ce travail que *L. monocytogenes* peut être isolée de 21 % des environnements domestiques (213 foyers enquêtés), et en particulier dans 10 % des salles de bains (tour du siphon des douches), 2 % des brosses à dents (1 échantillon sur 47), 2,5 % des réfrigérateurs, 1,5 % des éviers, mais 17 % des torchons et 7 % des brosses à vaisselle. Dans tous les cas, les quantités de *L. monocytogenes* isolées étaient supérieures à 100/cm², voire à 1000/cm².

- 106 Les enquêtes menées dans le cadre d'épidémies, chez les consommateurs touchés par la maladie, permettent d'évaluer le lien potentiel entre la souche isolée chez les malades et des isolats issus de l'environnement domestique. Dans ce cas, le nombre de malades étant généralement faible, aucune conclusion sur la prévalence ne peut être donnée. Une investigation néo-zélandaise (Brett *et al.* 1998) menée à partir de moules fumées a permis l'isolement d'une souche de *L. monocytogenes* dans le réfrigérateur d'un patient, mais avec un pulsotype différent de celui du malade. Au contraire, une enquête menée en Italie lors d'une listériose déclarée à symptomatologie gastro-intestinale, a permis l'isolement dans un congélateur d'une souche de *L. monocytogenes* de même profil (lysovar et MEE) que celle isolée à partir des malades. Cependant, cette enquête n'a pas permis de conclure formellement sur l'origine de la contamination.

Question n°15 : Que sait-on de l'écologie de *L. monocytogenes* dans les différentes filières agro-alimentaires ?

- En élevages industriels de porcs

- 107 Les études microbiologiques menées dans l'environnement des élevages de porcs et sur les animaux eux-mêmes (Gérard 1992 ; Adesiyun et Krishnan 1995) ont montré que la contamination était faible (12/228 des prélèvements réalisés dans le premier cas, 10/139 écouvillons rectaux dans le second). Cependant, ces études ont montré la forte domination de *L. monocytogenes* sérovar 4b dans ces élevages positifs (10/12 souches isolées dans le premier cas, 9/10 dans le deuxième). Cette forte prévalence du sérovar 4b est à rapprocher de son importance dans les épidémies associées à la consommation de produits de charcuterie, sans que, dans ces derniers cas, un élevage source ait pu être identifié.
- 108 Parmi les facteurs qui peuvent expliquer la contamination des élevages de porcs, certains auteurs mettent en avant le rôle joué par l'alimentation et notamment son origine et son humidité (Skovgaard et Norrung 1989) : les porcs nourris avec des granulés secs n'excrétaient *L. monocytogenes* dans leurs matières fécales que dans 2 % des cas, contre 25 à 50 % des porcs nourris avec des « soupes » fabriquées à la ferme. Celles-ci permettraient une multiplication de *L. monocytogenes*, et conduiraient à l'obtention d'une concentration supérieure à 10⁵ *L. monocytogenes*/g contre moins de 10 lors de la consommation de granulés secs.

- En élevages industriels de volailles

- 109 Le même type d'enquête (Toquin et Colin 1994 ; Toquin *et al.* 1995), réalisé dans des élevages avicoles, conduit aussi à déceler des contaminations très faibles (2,4 % à 7,2 % des prélèvements positifs). Aucune *L. monocytogenes* sérovar 4b n'a pu être mise en évidence dans les élevages enquêtés (31 au total).

- En industries de transformation des viandes

- ➔ *Abattage et découpe*

- 110 Le **Tableau V** présente des résultats de différentes enquêtes qui ont pu être menées dans les filières de production de viande. La variabilité du pourcentage de prélèvements contaminés observée peut en partie

être expliquée par les différences de plans d'échantillonnage (cf. paragraphe 61), de sites de prélèvements et de méthodes de recherche de *L. monocytogenes*. Cependant, ces résultats montrent combien l'amplification est réelle entre l'élevage (paragraphe 107 à 109) et l'abattoir puis la découpe.

- 111 Il est démontré (Van der Elzen et Snijders 1993), que lors de la découpe primaire de porcs, les couteaux, les tapis, les tables, les découpeuses et autres machines sont fréquemment à l'origine de la contamination par *L. monocytogenes*. Les travaux conduits par ces auteurs ont montré que si seulement 2 à 7 % des carcasses étaient positives en *L. monocytogenes* à l'issue de l'abattage (3,2 % dans une enquête de Gérard (1992)), 11 % des échine, 27 % des jambons et 36 % des colliers et épaules pouvaient être contaminés après la découpe.
- 112 L'examen bactériologique de la contamination des surfaces démontre clairement l'origine environnementale de ces *L. monocytogenes*. En effet, lors de cette étude, 71 % des machines, 83 % des sols et 100 % des bandes transporteuses se sont avérés contaminés par *L. monocytogenes* (Tableau VI).
- 113 Des études comparables menées récemment dans les abattoirs de volailles ont conduit à des résultats similaires (Radas *et al.* 1999).

Tableau V Contamination des viandes par *L. monocytogenes*

Espèce	Prélèvements	Pourcentage d'échantillons positifs	Référence
Volailles	Peau de cou de poulet	47 %	Skovgaard et Morgen (1988)
	Peau de cou de poulet	60 %	Pini et Gilbert (1988)
	Ecouvillonnage de poulets	14,7 %	Gitter (1976)
	Rinçage de carcasses	23 %	Bailey <i>et al.</i> (1989)
	Peau, foie et ailes	13,1 %	Genigeorgis <i>et al.</i> (1989)
	Peau de dinde	15 %	Genigeorgis <i>et al.</i> (1990)
	Peau de cou de poulet	14,3 %	Toquin et Lahellec (1990)
	Peau de poulet	50 %	Gohil <i>et al.</i> (1995)
Porcs	Carcasses	3,2 %	Gérard (1992)
	Carcasses	2 à 7 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
	Jambons	27 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
	Echine	11 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
	Collier, épaules	36 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
	Viandes fraîches	36 %	Beckers <i>et al.</i> (1989)
	Découpe de porc	19 %	Nicolas et Vidaud (1987)
	Dos	5,2 %	Corrégé (1997)
	Epaule découennée	8,3 %	Corrégé (1997)
	Gorge	5,2 %	Corrégé (1997)
	Hampe	0 %	Corrégé (1997)
	Jambon (viande)	8,3 %	Corrégé (1997)
	Poitrine (viande)	4,2 %	Corrégé (1997)
	Potrine (couenne)	6,3 %	Corrégé (1997)
	Jambon (couenne)	10,4 %	Corrégé (1997)
Bovins	Viande hachée	28 %	Skovgaard et Morgen (1988)
	Viande hachée	12 %	Bind et Delaval (1994)
	Viande hachée	7,5 %	Yu <i>et al.</i> (1995)
	Muscle	7 %	Gohil <i>et al.</i> (1995)
	Muscle	21 % à 26 %	Leistner <i>et al.</i> (1989)

Tableau VI Contamination des surfaces par *L. monocytogenes*

Surfaces	Bactéries recherchées	Pourcentage d'échantillons positifs	Référence
Mains	<i>L. monocytogenes</i>	7 %	Kerr <i>et al.</i> (1993)
Machines	<i>L. monocytogenes</i>	71 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
Sols	<i>L. monocytogenes</i>	83 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
Tapis	<i>L. monocytogenes</i>	100 %	Van der Elzen et Snijders (1993)
Epileuse	<i>L. monocytogenes</i>	17 %	Gill et Jones (1995)
Table de découpe	<i>Listeria sp.</i>	100 %	Gill et Jones (1995)
Tapis longues	<i>Listeria sp.</i>	50 %	Gill et Jones (1995)
Gants à mailles	<i>Listeria sp.</i>	0 %	Gill et Jones (1995)
Matériel de découpe	<i>Listeria sp.</i>	83 %	Sammarco <i>et al.</i> (1997)
Sols chambres froides	<i>L. monocytogenes</i>	13,3 %	Sammarco <i>et al.</i> (1997)
Lavabos	<i>L. monocytogenes</i>	7,1 %	Sammarco <i>et al.</i> (1997)

→ Salaisons

- 114 Les études réalisées en 1992-1993, lors des épidémies de listérioses impliquant des produits de charcuterie-salaison, ont montré que là encore, la forte contamination des surfaces de travail pouvait être à l'origine de l'apparition de faibles quantités de *L. monocytogenes* sur les produits.
- 115 Ainsi, en cours de production, 68 % des surfaces échantillonnées en secteur cru (découpe, désossage, préparation) et 33 % de celles échantillonnées en secteur cuit (cuisson, tranchage, manipulations après traitement thermique) pouvaient être souillées par *L. monocytogenes* (Toquin *et al.* 1993 ; Salvat *et al.* 1995). Après les opérations de nettoyage et de désinfection, ces pourcentages tombaient respectivement à 17 et 7,5 %. De même que les industries agro-alimentaires, la grande distribution peut intervenir dans cette chaîne de contamination par les pratiques de découpe des produits frais et transformés qui s'apparentent à celles d'un industriel.
- 116 L'existence de ces souches « résidentes » a été confirmée par la comparaison génotypique des isolats de *L. monocytogenes* recueillis lors des enquêtes relatives aux épidémies de 1992 et 1993. L'utilisation de différentes techniques de typage moléculaire a permis de préciser l'identité de certaines souches de *L. monocytogenes* recueillies dans les usines en cours de production et après les opérations de nettoyage et de désinfection (Ermel *et al.* 1997). Ceci tendrait donc à prouver la persistance de ces souches sur les surfaces entartrées ou recouvertes d'un biofilm, tout en sachant qu'un apport continu de *L. monocytogenes* est réalisé par la matière première (viande crue) et entretenu ensuite sur les produits cuits par l'intermédiaire de croisements de circuits. Ce rôle des *L. monocytogenes* résidentes a été confirmé lors d'études récentes dans les filières avicoles et porcines. Le suivi réalisé dans plusieurs entreprises agro-alimentaires pendant plusieurs mois a montré que les mêmes génotypes obtenus par macro-restriction et électrophorèse à champ-pulsé (RFLP-PFGE) pouvaient être identifiés même à plusieurs mois d'intervalle en cours de production comme après les opérations de nettoyage et de désinfection (Giovannacci *et al.* 1999 ; Chasseignaux *et al.* 2000). Ces mêmes études ont démontré l'existence d'un clone de *L. monocytogenes* (sérovary 1/2a) commun aux ateliers d'abattage et de transformation des filières avicoles et porcines et dominant surtout en filière porcine où il représente près de 50 % des isolats.
- 117 Ainsi, les carences des opérations de nettoyage et de désinfection, si elles ne sont pas rigoureusement conduites, constituent une source potentielle de *L. monocytogenes* dans les entreprises agro-alimentaires.

• En productions laitières

- 118 Le lait et les produits laitiers sont parmi les aliments les plus contrôlés, de la ferme au point de vente. Ils sont soumis à une chaîne de vérifications dont l'objectif est de garantir la sécurité du consommateur. Elle regroupe un ensemble de règles de travail et de contrôles institué tant par les pouvoirs publics que par la profession laitière. La qualité du produit à la ferme est surtout liée à l'hygiène, que ce soit des locaux, du matériel, du personnel, de la traite, mais aussi à la surveillance sanitaire des animaux et à une alimentation de qualité.

→ Lait cru

- 119 Les fréquences de contamination des laits crus, c'est-à-dire ceux qui n'ont subi aucun traitement thermique, sont variables selon les études effectuées dans différents pays (**Tableau VII**). Cette variabilité peut en partie être expliquée par les différences de plans d'échantillonnage (cf. paragraphe 61), de sites de prélèvements et de méthodes de recherche de *L. monocytogenes*.

Tableau VII Incidence de *L. monocytogenes* dans le lait cru d'après Ryser (1999)

Pays	Nombre d'échantillons analysés	Pourcentage d'échantillons positifs
Allemagne	635	0,3 %
Canada	1694	2,3 %
Ecosse	640	14,1 %
Finlande	256	5,1 %
France	1409	6 %
Irlande	589	4,9 %
Italie	290	2,8 %
Pays Bas	137	4,4 %
Suisse	4046	0,4 %
USA (Total)	5197	3,2 %
<i>Californie</i>	200	7 %
<i>Massachussets</i>	939	1,6 %
<i>Minnessota</i>	300	3 %
<i>Pennsylvanie</i>	2511	3,1 %

- 120 En 1995, Fenlon *et al.* ont consacré une étude sur le lait de tank à la ferme : les souches isolées ont été étudiées par typage par électrophorèse des protéines (« Multilocus Enzyme Electrophoresis » ou « MEE ») et les résultats ont permis d'émettre l'hypothèse, pour les fermes les plus contaminées, d'une source unique de contamination. Cependant, d'autres études françaises (Sanaa *et al.* 1993 ; Zundel *et al.* 1999) n'ont pas confirmé cette hypothèse.
- 121 La fréquence de contamination des lait crus par *L. monocytogenes* est variable ; il ne s'agit pas d'une présence aléatoire mais plutôt de la présence dans le lait de certains animaux seulement. Le lait de ces animaux, où la concentration en *L. monocytogenes* est sans doute élevée, contamine les laits indemnes lors des mélanges (cf. paragraphe 299).

→ *Laits traités thermiquement (thermisation, pasteurisation, U.H.T.)*

- 122 Est considéré comme thermisé un lait traité par un couple temps-température inférieur à la pasteurisation. Ce procédé semble très utilisé dans la fabrication des fromages. Peu de données sont disponibles à ce jour sur la présence et le comportement de *L. monocytogenes* dans ces laits.
- 123 Le traitement thermique utilisé dans les industries est en théorie suffisant pour assurer la destruction de *L. monocytogenes* ; cependant le résultat de la pasteurisation peut être variable en fonction de la souche à détruire et du taux initial de contamination de la matière première. Lorsque la montée thermique est instantanée et le refroidissement très rapide, la décroissance du nombre des cellules viables (estimée par l'absence de réduction et de changement de teinte d'un colorant) serait rapide et une température de 72°C appliquée pendant 15 secondes suffisante pour détruire des inoculum de l'ordre de 10⁶ UFC/ml (Lemaire *et al.* 1989). Cependant, des travaux montrent que *L. monocytogenes* peut être retrouvée après une pasteurisation à 71,6°C pendant 15 secondes, en particulier lorsque la concentration bactérienne initiale est supérieure à 10⁷ UFC/ml (Lovett *et al.* 1987). Les travaux de Potel (1953) ont montré que la bactérie était rapidement détruite dans le lait chauffé à 80°C, mais il existe des possibilités de survie à des traitements thermiques plus élevés, notamment en fonction des caractéristiques des souches et de l'acquisition de résistance. La pasteurisation recommandée à l'heure actuelle (72°C pendant 15 secondes), ou un traitement équivalent, est suffisant pour les niveaux de contamination des laits rencontrés le plus fréquemment. Les contaminations éventuellement mises en évidence, résultent généralement soit d'un problème technologique (pasteurisation insuffisante), soit d'une contamination secondaire (cas de l'épidémie de Boston en 1983 par des laits pasteurisés recontaminés) si les bonnes pratiques de fabrication ne sont pas respectées. D'une manière générale, les laits concentrés ne sont pas contaminés par *L. monocytogenes*, mais cette bactérie survit mieux dans les laits concentrés non sucrés que dans les laits concentrés sucrés où l'*a_w* de 0,83 est trop faible pour permettre la croissance de *Listeria*. *Listeria* est très rarement isolée de lait en poudre, milieu dans lequel elle peut survivre mais pas se multiplier (McLauchlin 1987). Le traitement de stérilisation à Ultra Haute Température (UHT), soit au moins 1 seconde à 132°C, garanti l'absence totale de *L. monocytogenes* dans les échantillons traités.

→ *La transformation laitière*

- 124 Il existe un certain nombre de publications décrivant les contaminations et les pratiques à risque concernant l'industrie laitière (Jacquet *et al.* 1993 ; Sanaa 1994 ; Fenlon *et al.* 1995 ; Sutherland et Porritt 1995, 1996 ; Miettinen *et al.* 1999).

- 125 Un travail important décrit avec précision l'ensemble des points critiques décelés en industrie laitière (Sutherland et Porritt 1996). Selon le type de production, l'incidence de *L. monocytogenes* est plus ou moins importante et cette industrie serait particulièrement touchée du fait des procédés et des conditions de fabrication, en particulier de l'humidité ambiante, favorables à la survie et à la croissance des *L. monocytogenes*.
- 126 L'utilisation des techniques de typage génomique pour la caractérisation des souches de *L. monocytogenes* isolées sur les sites de production se généralise et permet, dans de nombreux cas, de mettre en évidence l'implantation d'un type de souches spécifique à un site de production donné, pendant parfois de nombreuses années (Unnerstad *et al.* 1995 ; Sutherland et Porritt 1996). Cette observation permet, dans certains cas, de remettre en cause les techniques de nettoyage et de désinfection utilisées dans les usines (Miettinen *et al.* 1999). C'est également ce qui ressort de l'étude, menée entre 1996 et 1998 sur différents sites de production par Kerouanton *et al.* (1999), démontrant la présence de souches spécifiques à la filière fromagère, persistantes dans le temps et manifestement bien adaptées à l'environnement ; l'analyse de l'ensemble des échantillons indique une contamination globale de 4,6 % qui se situe principalement sur les fromages en cours de fabrication (10,2 %) et leur environnement (4,1 %), alors que celle des matières premières et des produits finis est très faible, respectivement de 2,8 % et 0,8 %. Les contaminations de l'environnement et des produits en cours de fabrication sont probablement liées.

Les fromages

- 127 Le comportement des *L. monocytogenes* est très variable selon les fromages (Larparent 1999). C'est essentiellement la technologie de fabrication fromagère qui conditionne ce comportement, compte-tenu du chauffage du lait ou du caillé d'une part, et des conditions d'affinage d'autre part (durée, évolution du pH et de la température, teneur en sel et activité de l'eau pour ne citer que les principaux paramètres influençant le développement bactérien). Certains fromages possèdent des propriétés inhibitrices de la croissance, voire même destructrices, de *L. monocytogenes*. Ainsi, les fromages frais qui présentent un pH acide, inférieur ou égal à pH 4,5, ne permettent pas la croissance voire la survie de *L. monocytogenes* ; c'est le cas des fromages frais et des fromages à pâtes molles acides comme les fromages de chèvre, ou des fromages durs à affinage très long comme le Parmesan. D'autres fromages inhibent la croissance de *L. monocytogenes* qui y survit un temps plus ou moins long ; c'est le cas des fromages à pâtes pressées en général (Gouda, etc.) ou de certains Bleus. Enfin, d'autres fromages permettent la croissance : c'est le cas de ceux à pâte molle, affinés, à croûte fleurie (Camembert, Brie, etc.) ou à croûte lavée (Munster, Maroilles, etc.) (Ryser et Marth 1987 ; Larparent 1999).
- 128 La contamination des fromages peut être importante au cours des différentes étapes de fabrication (Jacquet *et al.* 1993).
- 129 L'analyse épidémiologique des sérotypes et pulsotypes a montré une répartition significativement différente en fonction des filières de production de lait et de fabrication de fromages ; la circulation d'un seul et même clone au sein d'un site de production est fréquente et pourrait être liée à de mauvaises procédures de nettoyage et désinfection, ou à la présence d'un type de souche résistante à ces procédures.
- 130 Au cours d'une enquête ponctuelle sur les produits laitiers frais, les souches de sérovar 4b étaient particulièrement présentes dans les échantillons de matières premières, atteignant 50 % des isolats (Kerouanton *et al.*, 1999) ; mais dans d'autres conditions ne sont retrouvées que des souches du sérovar 1 (Fenlon *et al.* 1995). Par ailleurs, de nombreux pulsotypes différents ont été identifiés, chacun étant fréquemment spécifique d'un des sites de la filière.
- 131 Les niveaux de contamination peuvent être élevés dans les pâtes molles pasteurisées, jusqu'à 10^6 *Listeria/g*, plus variables dans les pâtes molles au lait cru, en corrélation avec la contamination de la matière première et en fonction des flores associées. La croissance des *Listeria* dans les fromages à pâte molle au lait pasteurisé suit l'évolution du pH. Au cours de l'affinage, les flores de surface alcalinisent la pâte et permettent aux *Listeria* de se multiplier. La multiplication se fait donc plus rapidement près de la croûte qu'en profondeur (Ryser et Marth 1987). Dans les fromages au lait cru, l'évolution est plus variable. Il semble bien que certaines flores associées, grâce aux bactériocines qu'elles peuvent produire, retardent ou empêchent le développement de *L. monocytogenes*. De nombreuses bactéries lactiques (*Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*) sont capables d'une certaine activité contre *L. monocytogenes*. Le système lactoperoxydase a des fonctions naturelles antimicrobiennes dans le lait ; son activité dépend du système enzymatique, de la présence de thiocyanate et de peroxyde d'hydrogène. Son action vis-à-vis de *L. monocytogenes* a été évaluée comme bactériostatique plutôt que bactéricide avec un effet plus important à basse température (Siragusa et Johnson 1989). D'autres auteurs (Boussouel 1998, Boussouel *et al.* 1999) ont montré que l'efficacité inhibitrice du système lactoperoxydase dépendait de la concentration de ses composants : selon les concentrations utilisées, un effet bactériostatique ou bactéricide peut-être obtenu. L'inhibition de *L. monocytogenes* dans le lait en présence du système lactoperoxydase est d'autant plus importante que le pH est acide ; l'efficacité inhibitrice du système lactoperoxydase peut être augmentée en substituant le pseudohalogénure SCN par les halogénures I ou par IO₃.

- 132 Ryser et Marth (1987) ont montré que lors du processus de fabrication du camembert à partir de lait pasteurisé, volontairement contaminé par *L. monocytogenes*, le nombre de *L. monocytogenes* augmentait dans les premières heures après la fabrication puis diminuait pendant 15 à 20 jours d'affinage. Une augmentation de la population a ensuite été observée de telle sorte qu'à 30 jours, la concentration ne dépassait pas le niveau qu'elle avait atteint dans le caillé. Après 65 jours d'affinage le nombre de *L. monocytogenes* atteignait 10^6 UFC/g.

Les yaourts

- 133 Les laits peuvent être un milieu de développement pour *L. monocytogenes*, mais le pH acide (pH 4,5) atteint en fin de fabrication du yaourt grâce à la fermentation lactique maîtrisée permet d'inhiber la croissance voire détruire *L. monocytogenes* (Schaak et Marth 1988).

Autres produits laitiers

- 134 *L. monocytogenes* n'est pas fréquemment isolée dans les crèmes et le beurre. Des souches de sérotype 3a ont récemment été isolées en Finlande dans du beurre et dans le site de production, à l'occasion de l'investigation d'une épidémie (Lyytikainen *et al.* 1999); les analyses ultérieures ont montré que la bactérie ne pouvait pas se développer dans ce milieu, mais que les taux de contamination initiaux étaient relativement élevés. Par ailleurs, *L. monocytogenes* se développe très bien dans les mélanges pour glaces, mais sa croissance est impossible à -18°C (Berrang *et al.* 1988 ; Palumbo et Williams 1991).

• En productions maraîchères et en productions de végétaux transformés

- 135 Plusieurs enquêtes menées dans des pays développés ont porté sur les légumes crus prêts à l'emploi sans une véritable description de la nature des produits : il est difficile de savoir si l'enquête porte sur les légumes de type « salade bar », produits dans des conditions indéterminées et qui ne sont pas protégés des contaminations après transformation, ou s'il s'agit de produits analogues à ce que l'on appelle « 4^{ème} gamme » en France, c'est-à-dire transformés dans des conditions d'hygiène spécifiées et protégés ensuite par un conditionnement adapté. Dans les pays développés, la fréquence d'échantillons positifs varie de 0 % à 30 % (Sizmur et Walker 1988 ; Lainé et Michard, 1988 ; Beckers *et al.* 1989 ; Bind 1989 ; Hildebrandt *et al.* 1989 ; Beaufort *et al.* 1992 ; Breer et Baumgartner 1992 ; Anonymous 1993 ; Arnold et Coble 1995 ; Manzanno *et al.* 1995 ; Garcia-Gimeno *et al.* 1996 ; Lin *et al.* 1996) et atteint 80 % en Malaisie (Arumugaswamy *et al.* 1994). Le cas de la France est intéressant dans la mesure où, avant 1990, des fréquences de respectivement 5 % et 9 % avaient été trouvées dans deux enquêtes publiées, tandis que depuis 1990, il semble que *L. monocytogenes* ne soit plus détectée dans des produits de 4^{ème} gamme. Cette « bonne qualité hygiénique » n'est pas une propriété intrinsèque des légumes puisque dans une même enquête, 4 % et 12 % de légumes vendus surgelés et cuits avaient été trouvés positifs (Pierre et Veit 1996). Les produits les plus fréquemment contaminés sont les crudités pour collectivités (Bind 1989), les pousses de soja (Michard *et al.* 1993) et les salades composées (Anonymous 1993).
- 136 La préparation, puis la transformation des matières premières en légumes prêts à l'emploi, sont des facteurs favorisant la contamination initiale ou croisée (Velani et Roberts 1991 ; Breer et Baumgartner 1992). En France, la DGCCRF rapporte un cas où le même sérovar de *L. monocytogenes* a été retrouvé sur les couteaux utilisés pour la découpe dans l'usine et sur le chou râpé issu de cet atelier (Lainé et Michard 1988).
- 137 Le lavage et la désinfection à l'eau chlorée agissent sur les cellules de *L. monocytogenes* comme sur les autres bactéries présentes sur la surface des végétaux ; cependant la désinfection des légumes par le chlore actif ne réduit que faiblement le nombre *L. monocytogenes* (1 puissance décimale environ) (Brackett 1987). Le lavage à l'eau permet d'éliminer au maximum 90 % de la population bactérienne, l'utilisation d'eau chlorée (au moins 30 mg de chlore actif/l) permet d'en éliminer au maximum 99 % (Nguyen-Thé et Carlin 2000). L'efficacité de la chloration serait diminuée par la formation de biofilms par la flore bactérienne sur la surface des feuilles et dans les stomates, qui protégeraient les cellules de *L. monocytogenes* (Gras *et al.* 1994).
- 138 *L. monocytogenes* peut se multiplier à la surface des légumes entiers ou découpés, si le pH est favorable, à des températures de 3°C ou plus. Les résultats varient fortement suivant les expériences, mais des tendances peuvent être dégagées (Nguyen-Thé et Carlin 1994, 2000).
- 139 Ainsi, la population maximale atteinte par *L. monocytogenes* est inférieure à celle des autres bactéries, même si la vitesse initiale de multiplication peut être élevée ; de plus, la population de cette bactérie est capable de se multiplier par un facteur maximal de 100 avant la détérioration des produits. D'autres travaux montrent l'absence de croissance de *L. monocytogenes* sur des légumes entiers ou découpés, sans qu'il soit possible d'avancer une explication.
- 140 Les carottes découpées semblent un cas à part car il a été démontré que le tranchage libère un facteur létal pour *L. monocytogenes* (Beuchat et Brackett 1990 ; NGuyen-Thé et Lund 1991) ; cet effet bactéricide disparaît après un stockage de quelques jours, après broyage, ou après cuisson (NGuyen-Thé et Lund

1991). De même, sur les tomates tranchées, le nombre de *L. monocytogenes* décroît au cours de la conservation (Beuchat et Brackett 1991).

- Fruits de mer et poissons

141 De nombreuses études, réalisées en France et à l'étranger (Ben Embarek 1994 ; Dillon *et al.* 1994 ; Eklund *et al.* 1995, Pierre et Veit, 1996 ; Brett *et al.* 1998), ont montré que certains poissons et coquillages pouvaient être contaminés par *L. monocytogenes*. La fréquence de contamination des poissons fumés varie de 0 à 50% selon l'origine géographique du poisson. Le niveau de contamination varie en fonction de l'origine (sauvage ou élevage), de la saison, de la technique de pêche, de la manipulation des poissons et du mode de conservation (réfrigération, congélation). L'incertitude demeure cependant sur l'origine de cette contamination. Lors de la production de saumon fumé, il semble que la surface de la peau, surtout lorsqu'elle est physiquement altérée, et les viscères du poisson cru soient les principales sources de contamination (Eklund *et al.* 1995). Le matériel et le personnel sont décrits comme des sources secondaires. Cependant, il semble que là encore l'environnement des ateliers, y compris dans les salles de fumaison, ait un rôle important dans la contamination finale des produits. Ainsi Rorvik (1995) a démontré la persistance du même type génomique de *L. monocytogenes* dans l'environnement des ateliers de fumaison, ainsi que sur les produits élaborés. Certaines pratiques de fabrication favorisent la contamination du saumon fumé à froid (Duffes 1999).

Question n°16 : Quel est le rôle des biofilms dans la colonisation d'un milieu par *L. monocytogenes* ?

- 142 L'existence de ces souches « résidentes » dans les ateliers, a été démontrée lors d'enquêtes réalisées après les épidémies françaises de 1992 et 1993. D'autres enquêtes ont été menées sur les « facteurs de risques » associés à la présence de *L. monocytogenes* sur les surfaces de 5 sites de production de viandes (Chasseignaux 1999) ; quelques conclusions peuvent en être tirées :
- 143 - les surfaces en acier inoxydable ou en carrelage, lisses, propres, d'un pH inférieur à pH 6, installées dans un atelier à température élevée et à faible hygrométrie, étaient significativement associées à l'absence de *L. monocytogenes*. Au contraire, les surfaces en résine ou en matières plastiques, abîmées, souillées, d'un pH neutre, et installées dans un atelier à température faible et hygrométrie forte, étaient significativement associées à la présence de *L. monocytogenes* ;
- 144 - concernant les interactions entre le statut microbiologique de la surface et la présence ou l'absence de *L. monocytogenes*, les relations suivantes ont été mises en évidence : la présence de *L. monocytogenes* sur la surface est significativement reliée à celle des entérocoques. Certains ribogroupes de *Brochothrix thermosphacta* et *Pseudomonas fragi* sont associés à la présence de *L. monocytogenes* sur les surfaces inertes. Au contraire, certains ribogroupes de *Pseudomonas libaniensis* sont présents en absence de *L. monocytogenes*.
- 145 L'action des désinfectants sur *L. monocytogenes* en biofilm ou adhérentes a fait l'objet de nombreuses études, démontrant la résistance accrue des bactéries colonisant les surfaces (Best *et al.* 1990 ; Frank et Koffi 1990 ; Lee et Frank 1991 ; Krysinski *et al.* 1992 ; Wirtanen et Mattila-Sandholm 1992a,b ; Somers *et al.* 1994 ; Fatemi et Frank 1999). La combinaison d'un traitement successif à la soude puis à l'acide acétique appliqués à 55°C semble la plus efficace pour détruire *Listeria monocytogenes* dans les biofilms (Arizcun *et al.* 1998).

Question n°17 : L'adhésion de *L. monocytogenes* aux surfaces inertes est-elle le résultat de facteurs intrinsèques à ce micro-organisme ?

146 Des travaux récents dans le domaine peuvent permettre d'émettre des hypothèses quant au rôle de ces différents facteurs. Lunden *et al.* (1999) ont montré que des souches « résidentes » de *L. monocytogenes* exprimaient des propriétés d'adhésion à l'acier inoxydable supérieures à des souches qualifiées de sporadiques. Par ailleurs, le rôle de biofilms « positifs » composés de souches de *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Micrococcus* (Briandet *et al.* 1999b ; Leriche-Sibille et Carpentier 1999) ou d'une souche de *Lactococcus lactis* productrice de nisine (Leriche *et al.* 1999,) a été démontré dans l'inhibition de l'adhésion de *L. monocytogenes* sur des surfaces inertes. En revanche, cette inhibition est totalement levée en présence d'une souche de *Pseudomonas fluorescens* produisant un biofilm très recouvrant par l'intermédiaire de biosurfactants, qui modifient considérablement les propriétés électriques de la surface considérée. Giovannacci *et al.* (2000) ont montré que les propriétés de surface de 5 isolats de *L. monocytogenes*, de génotypes différents, présentaient une variabilité importante lorsqu'ils étaient cultivés à 37°C. Des isolats de même sérovar (1/2a), très proches du point de vue génomique, expriment des propriétés de surface très proches à cette température alors qu'une autre souche de *L. monocytogenes* de

sérovar 3a, pourtant d'un génotype également proche, exprime des propriétés très différentes. Par ailleurs, des souches de même sérovar (1/2a) mais d'un génotype éloigné, expriment des propriétés différentes. Si de telles différences ont pu être mises en évidence à 37°C, il n'en fut pas de même à 4°C ; en effet après l'application d'un choc froid suivi d'une croissance à basse température, toutes les souches de *L. monocytogenes* testées ont exprimé des propriétés de surface identiques, témoignant en cela probablement d'un mécanisme adaptatif commun. Ceci pourrait expliquer partiellement l'affinité particulière de *L. monocytogenes* pour les surfaces froides. De même, les conditions de préincubation des souches avant les tests d'adhésion induisent un changement des propriétés de surface. Ainsi, l'affinité pour l'acier inoxydable de souches préincubées en présence d'acide lactique augmente (Briandet *et al.* 1999a).

Question n°18 : Quel est le rôle de la nature de la surface sur l'adhésion ?

- 147 Au-delà des facteurs intrinsèques de *L. monocytogenes*, la nature de la surface peut avoir une incidence non négligeable. L'énergie de surface des matériaux peut influencer l'adhésion bactérienne. Ainsi Helke et Wong (1994) ont montré que l'adhésion de *L. monocytogenes* était plus facile sur un acier inoxydable que sur du caoutchouc. Le lien entre la rugosité de la surface et l'adhésion de *L. monocytogenes* est moins net et la microtopographie des matériaux semble plus déterminante dans le comportement d'adhésion.
- 148 La présence de souillures protéiques (autres que les protéines du lait) sur les surfaces, peut entraîner une augmentation de l'adhésion des bactéries en présence. En revanche, selon les protéines du lait considérées, l'adhésion de cellules de *L. monocytogenes* est tantôt favorisée tantôt diminuée (Helke *et al.* 1993, Al-Makhlafi *et al.* 1994). Chez *L. monocytogenes*, l'adhésion est diminuée aux pH alcalins (pH 9), mais aux pH acides (jusqu'à pH 4) les cellules adhèrent sensiblement de la même façon qu'en condition neutre (Smoot et Pierson 1998a,b). Selon Smoot et Pierson (1998a), le nombre de cellules de *L. monocytogenes* adhérentes augmente avec l'augmentation de la température entre 10°C et 45°C. La température influence également de façon importante la force d'adhésion des cellules aux surfaces, mais pas le pH. D'autres auteurs, ont montré que, indépendamment de la mobilité cellulaire, il semble que les flagelles de *L. monocytogenes*, agissent comme une structure adhésive impliquée dans les premières étapes de l'adhésion (Vatanyoopaisarn *et al.* 2000). Or, les conditions de température régnant dans l'environnement des ateliers de production sont le plus souvent inférieures à 25°C. Dans ces conditions *L. monocytogenes* est sous forme flagellée, ce qui favoriserait donc l'adhésion. Jeong et Frank (1994) ont démontré la capacité de croissance de *L. monocytogenes* à 10°C au sein de biofilms, même en présence de flore compétitive isolée d'ateliers de production carnés ou laitiers. *L. monocytogenes* se développe plus lentement en présence de la flore compétitive mais ne disparaît jamais du biofilm où elle se maintient dans une proportion de 1% de la population totale. L'alternance des cycles de nettoyage et de désinfection modifie les caractéristiques des surfaces de travail qui modifieront les conditions pour l'adhésion.

Question n°19 : Quel est l'apport des méthodes de biologie moléculaire à la connaissance de l'écologie de *L. monocytogenes* ?

- 149 Les méthodes de biologie moléculaires décrites dans les paragraphes 73 à 83 s'avèrent indispensables pour comprendre l'écologie de *L. monocytogenes* dans un environnement (Giovannaci *et al.* 1999 ; Chasseignaux *et al.* 2000). Ces outils peuvent être employés non seulement pour les approches épidémiologiques mais aussi comme moyen d'aborder la résolution ponctuelle d'un problème industriel. En ce sens, une mise en commun de ces informations épidémiologiques aurait un intérêt certain dans l'épidémiologie de cette bactérie.

SECTION D : PATHOLOGIE HUMAINE

Question n°20 : **Quelles sont les formes cliniques de la listériose chez l'homme ?** (Bosseray *et al.* 1995 ; Canton *et al.* 1995 ; Papiernick *et al.* 1995 ; Struilou et Raffi 1997)

150 La période d'incubation de la Listériose après contamination alimentaire s'étend de un jour à plusieurs semaines (McLauchlin 1996).

- Listériose de la femme enceinte

151 Chez la femme enceinte, elle se traduit par un épisode fébrile, le plus souvent spontanément résolutif en quelques jours. Une remontée fébrile au moment du travail peut suivre une plus ou moins longue période d'apyrexie. Elle peut aussi passer inaperçue pour la mère. Elle peut entraîner la contamination du fœtus (listériose fœto-maternelle) ou de l'enfant lors de l'accouchement (listériose néonatale).

- Listériose néonatale précoce.

152 *L. monocytogenes* infecte l'enfant par voie hématogène transplacentaire, entraînant mort *in utero*, avortement, fausse-couche ou accouchement prématuré selon le stade de la grossesse. La majorité des cas diagnostiqués survient après le 5^{ème} mois, mais l'infection peut se déclarer antérieurement. L'infection du nouveau-né se révèle très rapidement. Elle se présente sous une forme septicémique qui prend le plus souvent l'allure d'une détresse respiratoire isolée ou accompagnée d'« hépato-splénomégalie ». Dans une forme évoluée, elle prend la forme de la granulomatosose septique infantile avec des granulomes bactériens disséminés, atteignant la plupart des organes et s'accompagnant d'un purpura ou d'éruption maculo-papuleuse ou maculo-pustuleuse. L'atteinte de la conjonctive est plus rare. L'anémie et la thrombopénie sont fréquentes. L'atteinte méningée accompagne très rarement ce tableau d'infection généralisée. L'enfant peut aussi naître sain, mais les prélèvements gastriques ou de méconium peuvent révéler *L. monocytogenes*. Dans ce cas un traitement s'impose.

- Listériose néonatale tardive

153 La méningite isolée à *L. monocytogenes* est retardée jusqu'à deux semaines par rapport à la naissance. Son origine fait l'objet de plusieurs hypothèses : infection du liquide amniotique, abcès rétroplacentaires. Le traitement rapide est, le plus souvent, suivi de guérison. Cette forme est rare : moins de 5 % des listérioses néonatales (Goulet *et al.* 1986).

154 La listériose néonatale nosocomiale a été décrite, mais reste excessivement rare.

- La listériose invasive de l'enfant et de l'adulte

- ➔ **Bactériémie**

155 C'est le tableau clinique le plus souvent rencontré chez les sujets immunodéprimés. Elle peut se compliquer d'une endocardite ou de rares infections focales.

- ➔ **Listériose neuro-méningée**

- Méningite

156 De début brutal, elle est précédée très souvent d'une hyperthermie sévère. Elle peut aussi se présenter sous une forme plus fruste, subaiguë (forme pseudo tuberculeuse). Sur le plan clinique, rien ne permet de distinguer une méningite à *L. monocytogenes* d'une méningite d'une autre étiologie.

- Méningo-Encéphalite

157 Le syndrome méningé s'accompagne de signes de souffrance encéphalique, surtout du tronc cérébral. Les paralysies des nerfs crâniens (paralysie oculomotrice, paralysie faciale périphérique etc.) sont caractéristiques. D'autres atteintes comme des hémiparésies, des hémiplégies, un syndrome cérébelleux peuvent être observées. L'évolution des signes neurologiques est asymétrique et s'étend sur plusieurs jours. Une forme d'emblée comateuse se rencontre dans 1/3 des cas environ. Les complications sont essentiellement respiratoires (détresse ou arrêt respiratoire).

Encéphalite

158 Cette forme est beaucoup plus rare. Dans ce cas hyperthermie, céphalées et vomissement précèdent les signes neurologiques de quelques jours et le diagnostic peut être très difficile. Elle atteint assez souvent le rhombencéphale (rhombencéphalite).

Abcès cérébraux

159 Ils sont rares et non obligatoirement liés à une méningite.

• Les listérioses non invasives

→ Gastro-entérites

160 Les gastro-entérites à *L. monocytogenes*, avec ou sans bactériémie, sont très rares.

→ Listériose cutanée (Owen et al. 1960 ; Mouton et Kampelmacher 1966 ; Cain et McKann 1986 ; McLauchlin et Gilbert 1990 ; Allock 1992 ; McLauchlin et Low 1994)

161 Cette affection semble être rencontrée occasionnellement chez des fermiers et des vétérinaires praticiens qui ont effectué des délivrances, des fouilles rectales ou des vêlages ou chez des bouchers après manipulation de carcasses. Des cas sont rapportés d'évolution défavorable vers une septicémie ou une méningite.

Question n°21 : Comment s'effectue le diagnostic biologique chez l'homme ?

• Diagnostic direct (Anonymous 1998b)

162 Le diagnostic est essentiellement fondé sur l'isolement bactériologique de *L. monocytogenes* du sang ou du LCR. L'hémoculture est souvent le seul moyen pour diagnostiquer une encéphalite à *L. monocytogenes*, le LCR ne se positivant que lorsque l'infection diffuse aux méninges (et donc tardivement). Du fait de l'ubiquité de *L. monocytogenes* et d'un portage de 5 % de la population (cf. paragraphe 258), les prélèvements périphériques, de muqueuse ou de selles ont très peu ou pas de valeur (en dehors de suppurations manifestes qui s'accompagnent d'une visualisation à l'examen direct).

163 Dans le cas de l'infection du nouveau-né ou du fœtus *L. monocytogenes* est isolé sur l'enfant (prélèvement gastrique, méconium), il peut être recherché dans le placenta.

• Diagnostic sérologique (détection d'anticorps)

→ Généralités

164 La détection des anticorps anti-*Listeria* n'a que peu d'intérêt si le germe est isolé en culture : le diagnostic bactériologique doit être privilégié pour la surveillance et la détection des épidémies. Les tests sérologiques peuvent être un appoint au diagnostic en cas de suspicion de listériose sans germe isolé en culture.

→ Anticorps dirigés contre les facteurs de virulence (anticorps anti-listériolysine O) (Gaillard et al. 1995)

165 La recherche d'anticorps contre un facteur de virulence a l'intérêt d'utiliser un antigène très spécifique du pathogène, la listériolysine O (LLO). Ce test utilise la méthode du Western-Blot. Il est important de réaliser au moins deux tests à 15 jours d'intervalle. Chez les patients présentant une infection aiguë, les titres oscillent entre 1/100 à 1/400 dans le premier prélèvement, et peuvent atteindre chez certains patients 1/1600 voire plus (1/5000) dans le 2^{ème} prélèvement. Les titres élevés sont très en faveur d'une exposition importante à *L. monocytogenes* ayant donné lieu à un processus invasif. L'absence d'anticorps anti-LLO n'élimine pas formellement le diagnostic chez les sujets fortement immunodéprimés.

→ Anticorps dirigés contre la bactérie (Gaillard et al. 1995)

166 De nombreux tests sérologiques de ce type (agglutination, fixation du complément, hémagglutination directe ou indirecte) ont été décrits. Ils sont, dans l'ensemble, peu sensibles, peu spécifiques et difficilement comparables entre eux et posent donc des problèmes d'interprétation. Ils ne sont pas recommandés.

Question n°22 : Existe-t-il un ou des traitements de la listériose chez l'homme ?

• Sensibilité aux antibiotiques

167 La sensibilité (en termes Sensible/Résistant) est donnée dans le **Tableau VIII**.

Tableau VIII Sensibilité aux antibiotiques selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), novembre 1999. Seuls les antibiotiques dont l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) précise soit explicitement la listériose, soit septicémie ou méningite font l'objet de la publication d'un spectre d'activité (en caractères gras). Les antibiotiques en caractères maigres n'ont pas fait l'objet d'une fixation du spectre par le CASFM.

Antibiotique	Sensible/Résistant	Antibiotique	Sensible/Résistant
Amikacine	S	Ciprofloxacine	R
Amoxicilline	S	Clindamycine	R
Amoxicilline + Acide clavulanique	S	Fosfomycine	S
Ampicilline	S	Gentamicine, Sisomicine	S
Céfalexine, Céfadrine, Céfadroxil, Céfatrizine, Céfaclor, Loracarbef	R	Imipénème, Méropénème	S
Céfalotine, Céfazoline, Céfapirine, Céfaloridine	R	Isépamicine	S
Céfamandole	R	Latamoxef	R
Céfépime	R	Lincomycine	R
Céfixime	R	Nétilmicine	S
Céfopérazone	R	Ofloxacine	R
Céfotaxime	R	Péfloxacin	R
Céfotétan	R	Pénicilline G	S
Céfotiam	R	Pipéracilline + Tazobactam	S
Céfotiam, Hexétil	R	Pipéracilline, Mezlocilline	S
Céfoxitine	R	Polymyxines	R
Cefpirome	R	Rifampicine	S
Cefpodoxime Proxétil	R	Synergistines	S
Ceftazidime	R	Teicoplanine	S
Ceftizoxime	R	Thiophénicol	modérément S
Ceftriaxone	R	Ticaracilline	S
Céfuroxime	R	Ticaracilline + Acide clavulanique	S
Céfuroxime, Axétil	R	Tobramycine, Dibékacine	S
Chloramphénicol	modérément S	Triméthoprime-sulfaméthoxazole	S
		Vancomycine	S

168 *L. monocytogenes* est une bactérie très sensible aux antibiotiques. Les résistances acquises aux antibiotiques sont rares et touchent les tétracyclines et les macrolides (Charpentier et Courvalin 1999).

- **Traitement** (McLauchlin *et al.* 1991 ; Struilou et Raffi 1997)

169 Le traitement de choix d'une listériose neuroméningée est fondé sur l'association ampicilline-aminoside. Chez l'adulte, l'ampicilline est administrée par voie veineuse à la dose de 200 mg/kg/jour. Chez le nouveau-né et l'enfant, la dose d'ampicilline est portée à 400 mg/kg/jour pendant les premiers jours de l'infection. La pénicilline G à la dose de 300 000 Unités Internationales (UI)/kg/jour peut remplacer l'ampicilline chez l'adulte. La gentamicine, associée à l'ampicilline, est administrée par voie musculaire ou veineuse à fortes doses (3-6 mg/kg/jour). La durée du traitement est de 3-4 semaines du fait de la possibilité de rechutes en cas de traitement trop court, surtout chez les sujets immunodéprimés. Si une listériose est suspectée et diagnostiquée par les hémocultures chez la femme enceinte, le traitement repose sur l'ampicilline (6 g/jour) par voie veineuse pendant trois semaines.

170 En cas d'allergie aux pénicillines, le triméthoprime-sulfaméthoxazole, associé à la gentamicine, donne de bons résultats (Spitzer *et al.* 1986 ; Pinède *et al.* 1993). Les modèles expérimentaux confirment que les antibiotiques les plus efficaces sont l'ampicilline et le triméthoprime-sulfaméthoxazole (Blanot *et al.* 1997, 1999).

Question n°23 : Quelles sont les suites d'une listériose chez l'homme ?

171 La mortalité globale est estimée à 25-30 % et les séquelles neurologiques sont fréquentes en dépit de l'antibiothérapie (Lavetter *et al.* 1971 ; Humbert *et al.* 1976 ; Bazin *et al.* 1977 ; Carbonnelle *et al.* 1978 ; Nieman et Lorber 1980, Goulet et Marchetti 1996). La mortalité de la listériose néo-natale est variable (5 à 17 %) et surtout liée au degré de prématurité. Des séquelles sont possibles comme l'hydrocéphalie (Aujard *et al.* 1995 ; Papiernick *et al.* 1995).

SECTION E : PATHOLOGIE ANIMALE

Question n°24 : Quels sont les animaux concernés par la listériose ?

- 172 La listériose est une infection essentiellement animale, accidentellement humaine. Elle sévit de façon sporadique chez les animaux, mais peut évoluer de façon endémique dans certains élevages en fonction des techniques d'élevage. Elle semble être présente surtout dans les zones tempérées, mais on peut la rencontrer dans le monde entier. On parle de géonose ou sapronose (ou saprozoonose) : la contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion des végétaux (Goret et Joubert 1976).
- 173 Sont reconnues comme pathogènes, pour les animaux et surtout chez l'homme, les *L. monocytogenes*. *L. ivanovii* peut être pathogène pour les petits ruminants, particulièrement chez les ovins (Nicolas *et al.* 1988 ; Chand et Sadana 1999). *L. innocua* bien que fréquemment isolée chez des animaux présentant des signes cliniques n'est généralement pas estimée pathogène. Dans certaines exploitations, son rôle pathogène est évoqué et mériterait une réelle expertise (Walker *et al.* 1994). Les autres espèces sont *L. weslimeri* et *L. seeligeri*.
- 174 Le **Tableau IX** explicite les espèces animales concernées (les annexes donnent des renseignements complémentaires et une importante bibliographie).
- 175 La listériose est connue depuis le début du siècle chez les lagomorphes et les rongeurs (Murray *et al.* 1926). Chez les animaux d'élevage, c'est après 1931 que les premières descriptions sont faites en Nouvelle Zélande et aux Etats-Unis (Gill 1931 ; Doyle 1932 ; Jones et Little 1934 ; Graham 1939). Ce sont des formes nerveuses qui sont essentiellement décrites chez les ovins sous l'appellation de « circling disease ». En France les premières descriptions de la maladie sont faites après 1940, ainsi que les premières synthèses de travaux (Forgeot *et al.* 1941 ; Verge et Goret 1941 ; Belin et Lagriffoul 1943 ; Lesbouyries 1943 ; Belin 1946 ; Lucas *et al.* 1955 ; Goyon et Lecomte 1957 ; Lucas et Seeliger 1957 ; Lucas *et al.* 1962). Les différentes formes cliniques de la maladie sont décrites : nerveuses, génitales (avortements), septicémiques, chez différentes espèces animales domestiques et sauvages. Dès 1940, l'« influence de l'alimentation est jugée indéniable » mais reste mal connue (Verge et Goret 1941). Le rôle de vecteurs possibles de contagion est supposé (rongeurs, oiseaux) (Goret et Joubert 1976).
- 176 A l'heure actuelle, la maladie sévit de façon sporadique chez les animaux mais peut évoluer de façon endémique dans certains élevages en fonction des techniques d'élevage. La contamination des animaux s'effectue le plus généralement par ingestion des végétaux. Ce sont les herbivores qui sont donc principalement atteints (Maupas *et al.* 1971 ; Nicolas *et al.* 1972, 1974, 1988 ; Lecoanet 1973 ; Bind et Delaval 1993, 1994 ; Brugere-Picoux 1994 ; Menard et Sanaa 1994 ; Sanaa et Menard 1994 ; Stahl *et al.* 1996 ; Joncour 1998 ; Vaissaire 1999a, b, 2000).
- 177 De très nombreux chercheurs étrangers ont travaillé sur le sujet (Olson *et al.* 1953 ; Gray 1960a, b ; Krüger 1963 ; Welshimer 1968 ; Seeliger 1971 ; Schroeder and Van Rensburg 1993 ; Loncarevic *et al.* 1994a, b ; McLauchlin et Low 1994 ; Weber *et al.* 1995a, b ; cf. annexe 1).

Question n°25 : Quelles sont les formes cliniques de la listériose chez l'animal ?

- Forme génitale

- 178 Elle peut s'observer chez les femelles gestantes de la plupart des espèces domestiques (cf. **Tableau IX**, **Tableau X** et annexe 1). Elle se caractérise par un avortement qui survient le plus généralement dans les derniers mois ou dernières semaines de gestation. Les cas peuvent être isolés ou groupés en fonction des conditions d'élevage, des méthodes alimentaires et de la qualité des végétaux distribués.

- Forme nerveuse

- 179 Elle s'observe chez des animaux de tous âges et de toutes espèces, les cas sont généralement sporadiques. Cette forme peut apparaître dans un troupeau après une série d'avortements. La maladie survient brutalement, des signes nerveux se manifestent d'emblée associés à une hyperthermie modérée. Les animaux se déplacent difficilement, titubent, tournent en rond, toujours dans le même sens (« circling disease ») puis tombent, demeurent en *decubitus* ; on observe des grincements de dents, du strabisme, de l'opisthotonos, du trismus, du ptyalisme, des paralysies faciales pouvant être unilatérales. Dans certains cas des conjonctivites, des kératites avec ulcérations sont visibles. Les animaux meurent rapidement malgré des traitements. Seuls les jeunes porcs peuvent présenter des troubles frustrés qui guérissent en général spontanément.

- **Forme digestive**

180 Dans certaines espèces (bovins, ovins, équins, carnivores) on peut observer quelquefois une entérite avant la survenue d'autres formes (**Tableau IX**, **Tableau X** et annexe 1).

- **Formes septicémiques**

181 Ces formes découlent des formes précédentes et sont souvent observées chez de très jeunes animaux (formes néo-natales).

- **Autres formes localisées**

182 Chez certaines espèces, diverses formes localisées sont observables :

- formes cutanées : carnivores, poissons ;
- formes respiratoires, mammaires (cliniques, sub-cliniques ou portage asymptomatique) : bovins, ovins, caprins, carnivores, lagomorphes ..., sous cutanées : lagomorphes, etc. (**Tableau IX**, **Tableau X** et annexe 1) ;
- formes conjonctivales, uvéites, kératites : bovins, ovins, caprins, lagomorphes, etc.

Tableau IX Espèces animales concernées par l'infection à *L. monocytogenes*

Espèce animale	Formes cliniques	Épidémiologie
Bovins, Ovins, Caprins	Formes cliniques	Maladie sporadique ou endémique possible, rares enzooties dans les troupeaux
Ruminants sauvages : Chevreuils, Lamas, Buffles	Formes cliniques plus rares	
Equins, Baudet	Formes cliniques plus rares	Rares cas dans les élevages
Porcins	Formes cliniques plus rares, porteurs sains surtout	Rares cas dans les élevages
Suidés sauvages	Formes cliniques plus rares, porteurs sains surtout	
Carnivores domestiques : Chiens, Chats	Formes cliniques très rares	
Carnivores sauvages : Renard, Raton laveur, Furet, Vison, Martre, Léopard, Coyote	Porteurs sains	
Lagomorphes : Lièvres, Lapins	Formes cliniques	Cas sporadiques dans les élevages
Rongeurs : Rat, Souris, Cobaye, Chinchilla, Gerbille, Lemming, Ecureuil, Campagnol, Cabiliai	Formes cliniques et porteurs sains	Formes endémiques ou enzootiques
Oiseaux : Volailles : Poule, Dindon, Pintade, Canard, Oie, etc.	Formes cliniques et porteurs sains	Cas sporadiques en élevages
Pigeon, Merle, Moineau, Mouette, Freux, Corbeau Gibier à plumes : Faisan, Perdrix, etc. Perroquet, Canari, Hibou des neiges, Grue, etc.	Formes cliniques très rares, porteurs sains	Cas individuels
Poissons : Carpe, Tanche, Truite, Silure, etc.	formes cliniques	Cas sporadiques dans les étangs
Batraciens : Grenouille, Crapaud, Salamandre		Porteurs sains
Reptiles ophidiens : Serpents		Porteurs sains
cheloniens : Tortues		Porteurs sains

183 Les symptômes de la listériose animale sont exposés dans le **Tableau X** (voir aussi l'annexe 1) :

Tableau X Symptômes et fréquence de la listériose animale

Animaux	Formes Cliniques	Remarques
Bovins/Ovins/Caprins	Formes abortives / Formes nerveuses	Les plus fréquentes
	Formes septicémiques	Font suite aux deux précédentes Néonatale le plus souvent
	Formes oculaires : conjonctivite, kératite, uvéite	Peuvent être associées ou non à d'autres pathologies
	Formes mammaires	Plus rares, portage le plus souvent
	Formes digestives	Décrites mais pas systématiques
Equins	Plus rares mais décrites et/ou constatées actuellement	
	Formes nerveuses	Existent, mais très rares
	Formes abortives	1 % des avortements
	Formes septicémiques	décrites chez le poulain
	Formes oculaires	?
	Formes digestives	décrites chez le poulain
Porcins	Rares mais décrites et/ou constatées actuellement	
	Formes nerveuses	Essentiellement chez les jeunes animaux, mais peuvent guérir spontanément
	Animaux souvent porteurs sains	
Carnivores	Très rares	
	Formes nerveuses	Chez jeunes animaux, associées ou non à d'autres pathologies (virales ou parasitaires)
	Formes septicémiques	très rares mais décrites
	Formes cutanées	
	Animaux porteurs sains	
Lagomorphes : Lièvre, Lapin domestique	Formes abortives et/ou génitales (pyomètre)	
	Formes nerveuses	
	Formes septicémiques	Font suite aux deux précédentes, néonatale le plus souvent sur tous les petits d'une portée
	Formes mammaires	
	Formes respiratoires	
	Formes cutanées et sous cutanées	
	Formes conjonctivales	
Rongeurs : Rat, Souris, Cobaye, Gerbille, Chinchilla	Formes septicémiques	Le plus souvent, maladie « épidémique » dans les élevages ou les colonies d'animaux sauvages.
	Formes conjonctivales et respiratoires	
	Porteurs sains importants	
Oiseaux : Poule, Dinde, Oie Canard, Pintade	Formes septicémiques le plus souvent (jeunes plus sensibles)	Cas sporadique en élevage, mais certaines exploitations peuvent être touchées jusqu'à 40 % de mortalité et plus (enzootie)
	Formes digestives	
	Formes nerveuses plus rares	
Gibiers à plumes, Oiseaux de volière	Formes nerveuses et/ou septicémiques	Cas individuels
Poissons : Carpe, Tanche	Formes septicémiques	Cas sporadiques en piscicultures d'étangs pouvant être associées ou non à d'autres pathologies et entraîner une forte mortalité
Truite, Silure	Formes cutanées	associées ou non au formes septicémiques
Batraciens : Grenouille, Crapaud, Salamandre	Porteurs sains	
Reptiles : serpents, Tortues	Porteurs sains	

184 On reconnaît un certain nombre de sérovars de *Listeria* plus fréquemment trouvés dans les infections. Pour *L. monocytogenes*, ce sont ceux qui appartiennent aux sérogroupes 1 et 4 (cf. Section H).

Question n°26 : Comment s'effectue le diagnostic biologique de la listériose chez l'animal ?

• Diagnostic bactériologique

185 Le diagnostic est fait à partir de prélèvements effectués sur les animaux : avortons, placenta, système nerveux central (encéphale, cervelet, bulbe), cœur et sang du cœur, foie, rate, peau éventuellement (cf. section B en médecine vétérinaire). L'ensemencement se fait sur milieux adéquats après broyage des échantillons prélevés.

• Diagnostic sérologique

186 La détection des anticorps anti *Listeria* est peu spécifique, elle peut avoir une utilité purement indicative si elle est effectuée sur plusieurs sérums d'animaux d'une exploitation à surveiller, mais l'isolement du germe reste la méthode de certitude.

Question n°27 : Existe-t-il un ou des traitements de la listériose chez l'animal ?

• Sensibilité aux antibiotiques

187 La sensibilité (en termes Sensible/Résistant) est donnée dans le **Tableau XI**.

Tableau XI Sensibilité des *L. monocytogenes* aux antibiotiques utilisés en milieu vétérinaire (Source Laboratoire Départemental d'Analyse des Côtes d'Armor, Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne).

Antibiotique	Sensible/Résistant	Antibiotique	Sensible/Résistant
Ac oxalinique	R	Kanamycine	S
Amoxicilline	S	Lincomycine	R
Amoxicilline + Ac clavulanique	S	Lincopectine	S
Ampicilline	S	Marbofloxacin	S
Apramycine	S	Néomycine	S
Cefaloxine	R	Spectinomycine	S
Colistine	R	Spiramycine	S
Enrofloxacin	S et/ou R	Sulfamides	R
Erythromycine	S	Tétracycline	S
Florfenicol	S	Tiamuline	R
Fluséquin	R	Triméthoprim + Sulfamides	S
Gentamicine	S	Tylosine	S

• Traitement

188 En pratique, on utilise l'association ampicilline-gentamicine, ou spiramycine-métronidazole ou ampicilline-colistine, ou les tétracyclines pendant 7 à 10 jours au moins, en fonction des formes médicamenteuses. On associe au traitement antibiotique un complexe vitaminique B en intra veineuse, pendant 3 jours (Joncour 1998 ; Ravier 2000). En cas d'avortement, on peut utiliser de l'amoxicilline localement par voie intra-utérine et par voie générale.

Question n°28 : Quelles sont les suites de la listériose chez l'animal ?

189 Il existe un pourcentage important d'échecs pour les formes nerveuses : une fois les symptômes installés, il est difficile de guérir l'animal, il faut traiter dès l'apparition des premiers troubles pour avoir quelques chances de guérison. L'animal peut garder des séquelles et devoir être abattu. Des guérisons sont obtenues dans les cas de conjonctivites ou d'uvéites.

SECTION F : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE

- 190 La gravité des infections à *L. monocytogenes* est liée au pouvoir invasif de ce pathogène capable de traverser le placenta et de pénétrer le système nerveux central (Farber et Peterkin 1991).
- 191 Une des caractéristiques remarquable de *L. monocytogenes* est sa capacité de survivre à l'intérieur des cellules qui constituent, aux différentes étapes du processus infectieux, des sanctuaires où les microorganismes sont à l'abri du système immunitaire (Mackaness 1962). Ce pathogène peut se multiplier dans les monocytes et les macrophages résidants des tissus, mais les polynucléaires neutrophiles sont très bactéricides pour *L. monocytogenes* (Czuprynski *et al.* 1984). Cette bactérie peut aussi envahir et se multiplier dans de nombreuses autres cellules de l'hôte infecté, incluant les cellules épithéliales (entérocytes), les fibroblastes, les hépatocytes et les cellules endothéliales (North 1970 ; Racz *et al.* 1972 ; Havell 1986). Cette multiplication intracellulaire est à l'origine de foyers granulomateux disséminés dans les tissus des hôtes infectés, constituant une miliaire infectieuse avec accumulation de cellules inflammatoires (polynucléaires, monocytes, lymphocytes, etc.). A partir des foyers granulomateux, *L. monocytogenes* peut disséminer par voie sanguine et infecter le système nerveux central et le placenta.

Question n°29 : Quelles sont les portes d'entrée de *L. monocytogenes* dans l'organisme ?

- 192 La porte d'entrée de l'infection chez l'homme est le plus souvent le tube digestif à la suite de l'absorption d'aliments contaminés (Schlech *et al.* 1983 ; Farber et Peterkin 1991). D'autres portes d'entrée ont été suspectées mais non démontrées (Gray et Killinger 1966) en particulier les voies respiratoires supérieures (angine, pharyngite, infection pseudogrippale). L'existence de Listérioses cutanées dans des métiers à risque (vétérinaires, éleveurs) laisse penser que la contamination est, dans ce cas, directe lors d'une manipulation d'animal infecté.

Question n°30 : Quelle est l'influence des conditions d'ingestion ? du statut gastro-intestinal ?

- 193 Les connaissances sur le statut gastrique et intestinal sont parcellaires et l'hypothèse d'une sensibilité accrue des sujets traités aux anti-acides mériterait d'être confirmée. En effet, les expérimentations conduites sur des modèles animaux (Schlech *et al.* 1993) ont montré que l'injection de cimétidine sensibilisait les rats à l'infection par *L. monocytogenes*.

Question n°31 : Quel est le statut de *L. monocytogenes* vis-à-vis des protections humorales non-spécifiques ?

- 194 *L. monocytogenes* est résistante au lysozyme et sa capacité à capter le fer à partir de la transferrine pour laquelle elle possède un récepteur lui permet de ne pas être inhibée par la carence en fer comme d'autres bactéries.

Question n°32 : Comment la bactérie pénètre-t-elle dans les tissus et les cellules ?

- 195 Le parasitisme intracellulaire de *L. monocytogenes* est le mécanisme crucial du pouvoir pathogène, expliquant le caractère invasif des bactéries et leur capacité rapide de dissémination. Le cycle de réplication intracellulaire se déroule en plusieurs étapes. Les bactéries entrent d'abord en contact étroit avec les cellules-hôtes grâce à une protéine de 80 kDa appelée l'internaline, codée par un gène chromosomique, le gène *inlA* (Gaillard *et al.* 1991). Cette protéine exposée à la surface de la bactérie interagit avec des récepteurs de type E-cadhérine présents sur les cellules infectées (Mengaud *et al.* 1996). Cette interaction spécifique induite dans les cellules eucaryotes, telles que les cellules Caco-2, un processus s'apparentant à la phagocytose (Gaillard *et al.* 1991). Un gène adjacent à *inlA*, appelé *inlB* (Gaillard *et al.* 1991), code pour une protéine de surface qui agirait en synergie avec l'internaline pour favoriser l'entrée dans les hépatocytes (Dramsi *et al.* 1995). A l'intérieur des cellules, les bactéries se trouvent dans le compartiment phagosomal qui est rapidement acidifié par des pompes à protons (De Chastellier et Berche 1994). Dans cet environnement acide, les bactéries ne peuvent pas se multiplier et vont tenter d'échapper au phagosome, où elles sont exposées à l'activité microbicide des cellules (fusion phagolysosomale, *burst oxydatif*). Les bactéries accèdent ainsi au cytoplasme et se multiplient dans cet environnement favorable (Gaillard *et al.* 1987). Cet échappement se fait par destruction de la membrane du phagosome du fait de l'action synergique de la listériolysine O (Gaillard *et al.* 1986 ; Beauregard *et al.* 1997), une exotoxine hémolytique de 58 kDa active à pH acide et codée par le gène *hly* (Geoffroy *et al.* 1987 ; Cossart *et al.* 1989), et d'une phosphatidyl-inositol phospholipase C codée par le gène *plcA* (Camilli *et al.* 1993). Cet

échappement doit être rapide, car si la fusion phagolysosomale survient, la bactérie sera détruite (De Chastellier et Berche 1994).

- 196 La réplication intracytoplasmique s'accompagne d'une polymérisation de l'actine F en actine G à la surface des bactéries. Il se crée une « comète » d'actine qui favoriserait la propulsion de certaines bactéries à l'intérieur de la cellule et même hors de la cellule (Mounier *et al.* 1990 ; Tilney *et al.* 1990). La polymérisation est due à la protéine bactérienne ActA (Kocks *et al.* 1992), qui entraînerait le processus de nucléation de l'actine par l'intermédiaire de protéines cellulaires, telles que la profiline. Le mouvement intracellulaire de *L. monocytogenes* induit par la protéine ActA entraîne la dissémination des bactéries aux cellules adjacentes, où elles sont entourées d'une double membrane cytoplasmique. Les microorganismes sont alors dans un environnement très différent de celui de la vacuole de phagocytose, à pH neutre et à l'abri de la fusion phagolysosomale qui ne peut survenir à cause de la double membrane. L'échappement de cette nouvelle vacuole est dû à la production d'une nouvelle phospholipase, la phosphatidyl-choline phospholipase C codée par le gène chromosomique *plcB* (Geoffroy *et al.* 1991 ; Mengaud *et al.* 1991 ; Raveneau *et al.* 1992 ; Vazquez-Boland *et al.* 1992).
- 197 L'ensemble de ces gènes de virulence est réparti en un îlot chromosomique de pathogénicité de part et d'autre du gène *hly* avec, en aval, l'opéron lécithinase rassemblant les gènes *mpl* (Poyart *et al.* 1993), qui code pour une métalloprotéase zinc-dépendante impliquée dans la maturation de la phosphatidyl-choline phospholipase C, et les gènes *actA* et *plcB* et, en amont, l'opéron *prfA*, comprenant le gène *prfA* et le gène *plcA* (Mengaud *et al.* 1991 ; Dramsi *et al.* 1993), et les gènes *inlA* et *inlB* qui se trouvent à une certaine distance sur le chromosome. L'ensemble des gènes de virulence est contrôlé positivement par l'activateur transcriptionnel *PrfA* (Mengaud *et al.* 1991 ; Dramsi *et al.* 1993).

Question n°33 : Quels sont les moyens physiologiques de lutte contre *L. monocytogenes* et la possibilité de son élimination naturelle ?

- 198 La résistance naturelle contre *L. monocytogenes* implique le recrutement et l'activation des cellules phagocytaires aux sites de l'infection. Un afflux massif de polynucléaires neutrophiles est précocement observé (Mackanness 1962). Les cellules détruisent les hépatocytes infectés, libérant les bactéries qui sont alors rapidement détruites par ces cellules phagocytaires (Rosen *et al.* 1989 ; Conlan et North 1991). Ce mécanisme de résistance semble parmi les plus efficaces mis en jeu lors de la primo-infection. Conjointement, les macrophages infectés par les bactéries produisent du TNF- α (*Tumor Necrosis Factor*) et de l'IL-12 (Tripp *et al.* 1993). Ces cytokines, en association avec des facteurs bactériens, activent les cellules NK (*natural killer*), qui produisent l'interféron γ (Dunn et North 1991). Cette cytokine en synergie avec TNF- α , active à son tour les activités bactéricides des macrophages (Wherry *et al.* 1991).
- 199 La résistance acquise spécifique fait suite à cette première vague de défenses non spécifiques. Cette résistance est liée à l'expansion clonale de cellules T dirigées contre des déterminants antigéniques de *L. monocytogenes*, et requiert la multiplication active des bactéries dans les cellules présentatrices (Berche *et al.* 1987a, b). Les cellules CD4- β et les cellules T- β sont surtout impliquées dans la formation des granulomes inflammatoires qui caractérisent les lésions tissulaires observées au cours de l'infection par *L. monocytogenes* (Mielke *et al.* 1988), mais ces cellules ne sont pas directement impliquées dans la protection. En revanche, les cellules T-CD8- β jouent un rôle important dans la protection par leur effet cytotoxique, exposant ainsi les bactéries intracellulaires aux polynucléaires neutrophiles et aux macrophages (Berche *et al.* 1989 ; Lukacs et Kurlander 1989 ; Baldrige *et al.* 1990 ; Czuprynski et Brown 1990 ; Goossens *et al.* 1992). Ces cellules cytotoxiques reconnaissent des peptides associés aux molécules de classe I du système majeur d'histocompatibilité, notamment ceux provenant de la listériolysine O (Berche *et al.* 1987a,b ; Brunt *et al.* 1990 ; Bouwer *et al.* 1992). Les cellules CD8 anti-listériolysine O, plus spécifiquement dirigées contre l'épitope 91-90, sont protectrices (Pamer *et al.* 1991 ; Harty et Bevan 1992). La listériolysine O est un antigène protecteur (Cornell *et al.* 1999). Les anticorps anti-listériolysine O sont retrouvés au cours de l'infection humaine et animale (Berche *et al.* 1990 ; Lhopital *et al.* 1993) et pourraient contribuer à l'immunité protectrice (Edelson *et al.* 1999).

Question n°34 : Quelle est l'histoire naturelle de *L. monocytogenes* dans l'organisme et dans les cellules ?

- La porte d'entrée digestive

- 200 La porte d'entrée de l'infection chez l'homme est le plus souvent le tube digestif à la suite de l'absorption d'aliments contaminés (Schlech *et al.* 1983 ; Farber et Peterkin 1991). D'autres portes d'entrée ont été observées ou suspectées.

- 201 Habituellement, la pénétration intestinale n'entraîne pas de diarrhée, bien que cela ait été récemment décrit pour une épidémie associée à un inoculum important (Dalton *et al.* 1997) et lors d'une Toxi-Infection Alimentaire Collective (TIAC) en Italie (cf. paragraphe 271).
- 202 Le lieu de pénétration dans la muqueuse digestive reste mal connu et se ferait de façon non spécifique (Pron *et al.* 1998), contrairement aux salmonelles et aux shigelles qui pénètrent par les cellules M des plaques de Peyer. Les bactéries sont ensuite retrouvées dans les plaques de Peyer (Carter et Collins 1974) où elles se multiplient dans les cellules dendritiques (Guzman *et al.* 1995). La dissémination pourrait alors se faire par voie lymphatique vers les ganglions lymphatiques régionaux, puis vers la circulation sanguine. Les monocytes infectés pourraient véhiculer les bactéries et les relarguer dans la circulation, où elles sont rapidement phagocytées par les macrophages résidents des tissus, et en particulier par les cellules de Küppfer du foie et les macrophages résidents de la rate (North 1970).

- La multiplication hépatique

- 203 Le foie apparaît comme un organe épurateur majeur, y compris pour les microorganismes présents dans le sang. Les hépatocytes sont le site de la multiplication de *L. monocytogenes* (North 1970 ; Gaillard *et al.* 1996), mais aussi de certaines bactéries telles que *Salmonella* Typhimurium ou *Francisella tularensis* et de nombreux virus. Les capillaires sinusoides du foie sont formés d'un endothélium discontinu de cellules endothéliales, de cellules de Küppfer et d'hépatocytes en contact direct avec la circulation sanguine. Les bactéries seraient phagocytées par les cellules de Küppfer et envahiraient les hépatocytes ou/et pourraient directement pénétrer dans les hépatocytes à partir de bactéries libres dans la circulation sanguine. L'intégrité à ce stade joue un rôle crucial dans la pénétration dans les hépatocytes (Gaillard *et al.* 1996). La multiplication bactérienne dans les tissus entraîne une réponse inflammatoire intense avec la formation des granulomes.

- L'infection du système nerveux central

- 204 La listériose neuro-méningée se manifeste chez l'homme par une méningite bactérienne lymphomonocytaire ou purulente. La localisation méningée est souvent associée dans près de la moitié des cas à des signes d'encéphalite (Gray et Killinger 1966). L'encéphalite est diffuse avec des abcès intracérébraux localisés de façon prédominante au rhombencéphale où apparaissent des abcès nécrotiques coalescents et multiples entraînant des pertes de substance très importantes du tissu nerveux. Plus rarement, il peut s'agir de formes encéphalitiques pures sans méningite (Gray et Killinger 1966). Cette atteinte du système nerveux central est singulière, car si elle est fréquemment observée avec les virus, elle est rarement rencontrée pour les bactéries pathogènes en dehors des méningo-encéphalites à *Mycobacterium tuberculosis* et de rares infections neuro-méningées à *Nocardia asteroides*, à *Brucella* ou à *Leptospira*. Certains parasites comme *Toxoplasma gondii* sont aussi capables de déclencher des encéphalites très graves surtout au cours du Syndrome d'Immuno-Déficiences Acquis (SIDA).
- 205 Cette rareté des encéphalites bactériennes est liée à la structure très particulière des capillaires cérébraux. Le tissu cérébral est remarquablement protégé par un endothélium très particulier des multiples stimuli agressifs, incluant les microorganismes éventuellement présents dans la circulation sanguine. Les capillaires cérébraux réalisent un système cellulaire complexe composé de cellules endothéliales entourées de péricytes, de cellules de la microglie périvasculaires et d'astrocytes qui apposent leurs terminaisons sur la membrane basale des cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales sont uniques : elles sont fortement associées les unes aux autres par des jonctions serrées ; les vésicules de pinocytose et les fenestrations sont rares dans ces cellules. Ces cellules endothéliales jointives contribuent à restreindre fortement les échanges métaboliques avec le sang. Les péricytes ont une fonction de musculature des capillaires cérébraux. Les astrocytes concourent au maintien des jonctions serrées et donc de la perméabilité des capillaires cérébraux. Les cellules de la microglie ont surtout une fonction macrophagique réalisant un feutrage protégeant fortement les capillaires contre les microorganismes qui pourraient les traverser. Cependant, le « tendon d'Achille » du système nerveux central est constitué par les organes péri-ventriculaires, principalement les plexus choroïdes qui sont perfusés par des capillaires sans jonctions serrées, hautement poreux comme les capillaires périphériques, et permettant la sécrétion de liquide céphalorachidien.
- 206 Peu de travaux ont été consacrés au passage de la barrière hémato-méningée par *L. monocytogenes*. Tout porte à croire que le système nerveux central est infecté par voie hématogène. La voie de pénétration des bactéries dans les espaces sous-arachnoïdiens reste obscure. Chez l'homme, il est rare d'observer des lésions des plexus choroïdes (Bazin *et al.* 1977), qui sont la voie habituelle de passage lors des méningites bactériennes. Cependant, au cours d'infections expérimentales aiguës utilisant de fortes doses de bactéries injectées par voie veineuse et entraînant une multiplication intense dans le foie, on peut observer des atteintes inflammatoires massives des plexus choroïdes avec de nombreuses bactéries visibles (Berche 1995). Cela ne semble pas la règle au cours de l'infection naturelle.

- 207 Le mécanisme par lequel les bactéries vont déclencher une encéphalite reste hypothétique. En se basant sur des données anatomopathologiques (Gill 1933 ; Biester et Schwarte 1939a, b ; Osebold et Inouye 1954a, b ; Cordy et Osebold 1959 ; Degen 1972), il semble que les bactéries soient capables de traverser les endothéliums des capillaires. L'encéphalite est caractérisée par la présence de microabcès dans la substance grise avec destruction des neurones et présence de manchons cellulaires périvasculaires caractéristiques. Ces microabcès sont disséminés à l'ensemble de l'encéphale, mais sont très nombreux dans le tronc cérébral, réalisant une rhombencéphalite. Outre le passage possible par les plexus choroïdes, les bactéries pourraient gagner l'espace sous-arachnoïdien après franchissement des capillaires cérébraux et diffusion de proche en proche le long de l'espace de Virchow-Robin où baigne le liquide céphalorachidien.
- 208 Les mécanismes moléculaires qui permettent à *L. monocytogenes* de traverser les endothéliums et d'envahir le système nerveux central restent mal connus. La bactériémie est essentielle au passage des bactéries à travers les capillaires cérébraux chez la souris (Berche 1995). Il est possible que les bactéries adhèrent directement et entrent dans les cellules endothéliales, à l'instar de certains pathogènes comme *N. asteroides* pour lequel ce passage direct a été démontré *in vivo* par des études au microscope électronique (Beaman et Ogata 1993). On sait que ce pathogène est capable de se multiplier dans les astrocytes mais pas dans les cellules de la microglie (Beaman et Beaman 1993 ; Ogata et Beaman 1992). L'alternative serait que *L. monocytogenes* traverse les endothéliums par diapédèse à partir de monocytes sanguins contenant des bactéries (Beaman et Ogata 1993). Il a été montré que certains facteurs de virulence (listériolysine O, phospholipases), activent les polynucléaires neutrophiles (Sibelius *et al.* 1999). Les endothéliums pourraient être perméabilisés par des médiateurs de l'inflammation tels que le TNF- α , ou l'interleukine-1, ce qui entraînerait la production de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales et l'adhérence des monocytes chargés de bactéries au contact de ces endothéliums (Krüll *et al.* 1997 ; Drevets 1998). Les bactéries pourraient alors franchir l'endothélium avec les monocytes au cours de la diapédèse (Drevets 1999), ou par dissémination de cellule à cellule entre les monocytes et les cellules endothéliales. Il a été récemment montré que la listériolysine O active l'expression *in vivo* des molécules d'adhésion de type ELAM et ICAM-1 exprimées à la surface des cellules endothéliales (Kayal *et al.* 1999). Ceci est la conséquence de l'activation *in vivo* de NF- κ B, un activateur transcriptionnel cellulaire des gènes codant pour les molécules d'adhésion et de cytokines de type IL-8 (Kayal *et al.* 1999).
- 209 Dans le tissu cérébral, les nombreux microabcès, d'abord très petits, sont constitués de monocytes et de polynucléaires, et évoluent rapidement vers la nécrose du tissu nerveux. Ces foyers sont entourés de nombreuses cellules de la microglie mobilisées au contact du foyer et douées de propriétés phagocytaires. Ces foyers peuvent atteindre plusieurs millimètres de diamètre. Les bactéries dans le tissu cérébral apparaissent la plupart du temps associées aux cellules phagocytaires, mais peuvent parfois se trouver libres à la périphérie des foyers infectieux. L'atteinte infectieuse bulboprotubérentielle sévère entraîne souvent une infection centrifuge le long des premiers millimètres des nerfs crâniens adjacents, expliquant par exemple les paralysies faciales observées au cours des listérioses neuroméningées. La topologie de ces lésions dans le tronc cérébral n'est pas clairement élucidée. L'explication la plus simple serait que le tronc cérébral est une zone très richement vascularisée du système nerveux central. La fréquence des lésions serait donc liée à la richesse des capillaires dans le bulbe. Cette atteinte préférentielle du tronc cérébral a fait évoquer la possibilité d'une infection du système nerveux par voie nerveuse, par l'intermédiaire des nerfs crâniens innervant les voies aériennes supérieures. Bien que cette voie ait été suggérée expérimentalement chez l'animal (Asahi *et al.* 1957), elle est probablement tout à fait exceptionnelle au cours de l'infection naturelle.

• L'infection materno-infantile

- 210 La contamination de la mère se fait par voie orale et suit un processus identique à celui précédemment décrit. La gestation certainement sensibilise à l'infection en diminuant les défenses immunitaires, surtout au cours du 3^{ème} trimestre de la grossesse. Ainsi, la grossesse semble favoriser la croissance bactérienne dans le foie et la rate des animaux infectés par *L. monocytogenes* (Siddique *et al.* 1978). La listériose chez la femme enceinte présente un certain nombre de caractéristiques particulières. Tout d'abord, les signes cliniques chez la mère sont souvent peu fréquents ou résumés à un syndrome pseudogrippal avec fièvre et frissons, fatigue, maux de tête et myalgies qui peuvent précéder l'accouchement de 2 à 14 jours ou plus. Une rechute fébrile, avec bactériémie, est souvent observée au cours de l'accouchement. La plupart des listérioses sont décrites après le 5^{ème} mois de grossesse, mais des avortements spontanés ou répétés peuvent survenir avant cette date. L'infection après le 5^{ème} mois peut souvent entraîner un accouchement prématuré. En effet, la gestation est inférieure à 35 semaines dans près de 70 % des cas de listérioses maternelles (McCracken et Bishara 1990).
- 211 L'enfant peut être contaminé de deux façons : *i*) la plupart du temps par voie sanguine *in utero* (90 % des cas) avec colonisation du placenta où de multiples abcès se forment ; *ii*) beaucoup plus rarement, à la naissance ou dans la période précédant immédiatement l'accouchement, par contamination ascendante du

liquide amniotique ou par contamination au cours du passage de la filière génitale (moins de 10 % des cas). Tout à fait rarement, des contaminations nosocomiales manuportées ont été rapportées dans des maternités.

- La listériose néonatale précoce

212 Le nouveau-né est infecté *in utero* à la suite d'une bactériémie de la mère. D'après des données expérimentales (Hamada *et al.* 1981 ; Luft et Remington 1982 ; Bortolussi *et al.* 1984 ; Redline et Lu 1987), la première étape de l'infection est la colonisation du placenta, comme le suggère la présence de nombreux granulomes inflammatoires visibles dans les villosités et la *decidua*. Cette infection est rapidement associée à une chorioamniotite et à une infection sévère de l'enfant *in utero*. L'infection est évidente dès la naissance avec cyanose, apnée, détresse respiratoire et troubles de la conscience. Une pneumonie péribronchiale ou associée à des infiltrats diffus, plus rarement miliaires, est souvent retrouvée. Dans certaines formes très sévères, appelées *granulomatosis infantiseptica*, on observe une granulomatose disséminée à la plupart des organes, tout particulièrement le foie, les poumons et les méningites, mais aussi la rate, le tube digestif et l'oesophage, les organes lymphoïdes (amygdales, thymus, moelle osseuse), les surrénales, les muscles (squelettiques, myocarde) et la peau. Les atteintes digestives et pulmonaires sont liées à l'infection du liquide amniotique dégluti ou « inhalé ». Dans ces formes graves, évoluant depuis plusieurs jours, la mortalité est élevée (parfois 50 à 75 %).

- La listériose néonatale tardive

213 Dans un nombre faible de cas, le nouveau-né est contaminé dans la période périnatale ou au cours de l'accouchement, sans qu'il y ait d'infection placentaire. L'enfant naît apparemment sain et l'infection apparaîtra 8 à 28 jours après l'accouchement. Dans près de 95 % des cas, il s'agit d'une méningite purulente avec fièvre, insomnie, irritabilité, troubles de la conscience. Rarement, il s'agit d'une colite à *L. monocytogenes* (moins de 5 % des cas) avec diarrhée et septicémie, mais sans méningite. Le diagnostic est habituellement rapidement établi, expliquant la faible mortalité dans cette forme clinique.

Question n°35 : Quels statuts immunitaires influencent la maladie ?

- La sensibilité des divers groupes humains est-elle liée à l'immunité ?

214 La gestation certainement sensibilise à l'infection en diminuant les défenses immunitaires, surtout au cours du 3^{ème} trimestre de la grossesse. Ainsi, la grossesse semble favoriser la croissance bactérienne dans le foie et la rate des animaux infectés par *L. monocytogenes*.

215 Le système immunitaire, la plupart du temps, contrôle l'infection chez les sujets immunocompétents qui feront une infection *a minima*, souvent totalement asymptomatique. Ceci est probablement le scénario le plus fréquent, si l'on considère la fréquence de l'exposition par *L. monocytogenes* et la rareté de la maladie clinique. Cependant, si l'inoculum a été massif ou chez certains sujets fragilisés (femmes enceintes, patients immunodéprimés sous chimiothérapie, patients sidéens ou présentant des anomalies hépatiques tels que cirrhose ou hémochromatose ou encore chez certains sujets qui pourraient être génétiquement prédisposés), l'infection n'est pas contrôlée par le système immunitaire au cours de la phase hépatique et les bactéries sont relarguées dans la circulation sanguine. C'est à ce stade que des localisations métastatiques sont possibles, en particulier vers le placenta et le système nerveux central.

216 Un rôle direct du fer dans le pouvoir pathogène expérimental de *L. monocytogenes* pour la souris a été décrit initialement par Sword (1966). Cet auteur a montré que la Dose Léthale 50 (DL50) de *L. monocytogenes* était plus faible pour des souris surchargées en fer que pour des animaux non traités. Inversement, la DL50 était plus élevée pour des souris traitées par un chélatant du fer (Desféral™). Dans le même ordre d'idée, l'hémochromatose est considérée comme un facteur de risque mais d'autres raisons que l'augmentation du fer libre et lié à la transferrine, en particulier l'atteinte hépatique peuvent aussi être mises en cause.

- Quel est le rôle de paramètres non immunitaires dans la sensibilité ?

217 Aucune étude ne semble montrer de paramètres non immunitaires (génétiques par exemple) dans la sensibilité.

Question n°36 : Quelles sont les connaissances sur les facteurs de virulence de *L. monocytogenes* et leur variabilité ?

- 218 Comme beaucoup d'autres êtres vivants, *L. monocytogenes* développe durant sa vie saprophytique les réponses moléculaires rapides lui permettant de survivre à des conditions hostiles, telles que la tolérance à haute et basse température (de moins de 0°C à 42°C), les carences nutritionnelles, les variations de pH et osmolarité, des stress chimiques et la compétition avec d'autres micro-organismes (Gray et Killinger 1966). Un réseau complexe est ainsi élaboré par *L. monocytogenes* pour maintenir la viabilité cellulaire qui lui permet de survivre aux différents stress environnementaux, y compris, occasionnellement, dans les tissus de l'hôte infecté, incluant le compartiment phagosomal des macrophages. Il a été montré que durant la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* dans des lignées cellulaires de type J774 (Hanawa *et al.* 1995), de nombreuses protéines sont sélectivement induites à l'intérieur des macrophages. Les conditions de stress induisent la production de listériolysine O (Sampathkumar *et al.* 1999).
- 219 Il est apparu qu'une protéine de stress de type HSP/100, appelée ClpC ATPase, est impliquée dans la survie à l'intérieur des macrophages et requise pour la virulence chez la souris de *L. monocytogenes* (Rouquette *et al.* 1996, 1998). Les protéines HSP100 font partie d'une famille largement conservée dans le monde procaryotique et eucaryotique. Ce sont des « protéines chaperonnes » qui permettent, en condition de stress, de dissoudre les agrégats protéiques et, éventuellement, de dégrader ces protéines à l'aide de protéases bactériennes. La ClpC ATPase de *L. monocytogenes* promeut l'échappement précoce des bactéries du compartiment phagosomal des macrophages. Récemment, au moins deux autres protéines de type Clp ont été impliquées dans la virulence de ce microorganisme : *i*) une HSP/100 de type ClpE, requise pour la survie prolongée à haute température et pour la virulence et qui agit de façon synergique avec la ClpC ATPase de *L. monocytogenes* (Nair *et al.* 2000) ; *ii*) une sérine-protéase ClpP agissant en synergie avec ClpC et requise pour la croissance intracellulaire de *L. monocytogenes* (Gaillot *et al.* 2000). Ces protéines de stress et cette protéase jouent donc un rôle majeur dans la survie intracellulaire de *L. monocytogenes*, et probablement dans la survie de ces microorganismes dans l'environnement. Il est probable que d'autres protéines de stress encore inconnues soient également impliquées dans la virulence de *L. monocytogenes* et concourent à la survie dans l'environnement et dans les aliments.
- 220 De nombreuses méthodes ont déjà été utilisées pour déterminer la virulence des souches de *L. monocytogenes*, dont le test d'Anton, le test sur poule fertilisée et les tests utilisant des animaux immuno-compétents ou immuno-compromis, particulièrement des souris (Brosch *et al.* 1993 ; Hof *et al.* 1994). Le modèle souris immuno-compromise (ICMM), dans lequel les macrophages sont inactivés par le carragénate, montre une différence considérable entre la dose létale 50% (DL50) des espèces virulentes et des non-virulentes (Stelma *et al.* 1987 ; Tabouret *et al.* 1991). Parmi les modèles *in vivo*, l'énumération des bactéries viables dans les organes a donné les résultats quantitatifs les plus consistants dans l'évaluation de la virulence (Brosch *et al.* 1993). Les infections orales chez la souris, qui miment la voie naturelle de l'infection ont donné des résultats moins reproductibles (Audurier *et al.* 1980). Cependant entretenir un nombre suffisant de souris pour le test en routine est cher et demande du temps.
- 221 Plus récemment, des marqueurs génétiques ou phénotypiques de virulence ont été utilisés (Wernars *et al.* 1992 ; Kerr *et al.* 1995 ; Wiedman *et al.* 1997). Différents essais de cultures cellulaires (TCA) ont aussi été développés pour étudier la virulence des *Listeria* (Gaillard *et al.* 1987). Certains travaux ont étudiés l'utilisation potentielle de lignées cellulaires continues pour faire la distinction entre les *Listeria* pathogènes et les non-pathogènes avec un test cytotoxique (Farber et Speirs 1987 ; Bhunia *et al.* 1995). Pine *et al.* (1991) ont étudiés l'effet pathogénique en cellules Caco 2 afin de différencier les souches de *L. monocytogenes* virulentes des non-virulentes en comparaison à la virulence obtenue sur souris par la DL50. Cependant, ce test de virulence fournit des résultats plutôt qualitatifs que quantitatifs.
- 222 Dans l'étude de Van Langendonck *et al.* (1998), la valeur potentielle de 2 essais de culture cellulaire a été testée. Le test de pénétration et de multiplication (PM) permet d'évaluer l'entrée et la multiplication intracellulaire de la bactérie en cellules Caco 2 alors que le test de formation de plaques (PF) permet d'évaluer la capacité de la bactérie à former des plaques en monocouches de cellules Caco 2. Ces deux tests ont été comparés au test ICMM choisi initialement pour typer les souches de *Listeria* au niveau de leur virulence (Stelma *et al.* 1987). Les résultats de cette même étude ont montré que le test PF pouvait être supérieur aux résultats obtenus *in vivo* par comptage des bactéries isolées de la rate de la souris. Cette étude a d'autre part montré l'existence de souches de faible virulence et la variabilité des résultats en fonction de la méthode utilisée pour la mesure de cette virulence. Le modèle murin traité au carragénate est la procédure approuvée par le Food and Drug Administration (USA) pour déterminer la virulence des isolats de *Listeria* (Bhunias *et al.* 1995).

Question n°37 : Quels sont les facteurs environnementaux modulant la virulence ?

- 223 Comme cela a été montré chez d'autres pathogènes, la virulence de *L. monocytogenes* est régulée génétiquement en réponse à des signaux de son environnement. Parmi les signaux identifiés jusqu'ici, la température, le fer, le cellobiose (Park et Kroll 1993). D'autres facteurs moins bien identifiés, globalement inclus dans le vocable de « stress », incluant les radicaux oxygénés, l'acidification, les enzymes lysosomiaux, déterminent l'apparition de protéines de stress contribuant à la virulence du pathogène en position intracellulaire.
- 224 Le rôle direct du fer dans le pouvoir pathogène expérimental de *L. monocytogenes* pour la souris a été décrit initialement par Sword (1966). Cet auteur a montré que la DL50 de *L. monocytogenes* était plus faible pour des souris surchargées en fer que pour des animaux non traités. Inversement, la DL50 était plus élevée pour des souris traitées par un chélatant du fer (Desféral™). L'effet « sidérophore-like » des catécholamines se manifeste également dans l'infection expérimentale de la souris. L'ensemble de ces données suggère fortement un rôle des catécholamines dans la physiopathologie de la listériose neuro-méningée en favorisant la capture du fer par les bactéries. Cowart et Foster (1981) et Cowart (1987) ont observé que la production de listériolysine O, facteur de virulence majeur de *L. monocytogenes*, était inversement proportionnelle à la concentration en fer du milieu. Il semble donc que la bactérie réponde à une déplétion en fer en augmentant la synthèse de l'hémolysine. Cependant, bien que la production d'hémolysine soit une condition essentielle à la virulence de *L. monocytogenes* aucune corrélation entre le taux d'hémolysine produite *in vitro* et la virulence des souches, mesurée par la DL50 pour la souris, n'a pu être établie. Ces travaux attendent confirmation chez l'homme.
- 225 Pour tenter de mieux comprendre les relations entre le microenvironnement du germe et l'expression de sa virulence, il faut envisager les trois niveaux essentiels suivants *i*) l'environnement extérieur (vie saprophytique) ; *ii*) l'intestin (grêle), *iii*) la cellule hôte (macrophage, hépatocyte, etc.) ce qui conduit aux scénarios possibles suivants :
- 226 Dans le milieu extérieur, la température est généralement inférieure à 30°C, le fer abondant et assimilable grâce aux catéchols naturels jouant le rôle de sidérophores, et le cellobiose ubiquitaire en tant que produit de décomposition de la cellulose. La conjonction de ces paramètres entraîne vraisemblablement la répression des facteurs de virulence. Dans son environnement naturel, et ceci est une évidence, *L. monocytogenes* n'est pas virulente, bien qu'elle garde intact tout son potentiel de virulence.
- 227 Dans l'intestin, et plus particulièrement au niveau du grêle, la bactérie va soit être entraînée et éliminée si elle se trouve en petit nombre, soit pénétrer dans les entérocytes. La probabilité de cette éventualité est d'autant plus grande que la population est plus dense (importance de la dose infectante) et que les facteurs induisant l'endocytose (InIA, etc.) sont exprimés de façon optimale. La régulation de l'expression des facteurs de virulence est donc particulièrement cruciale à ce niveau pour la suite du scénario. La température est optimale (37°C), et le cellobiose rare puisque la cellulose n'est pas digérée à ce stade. Il y a donc dérépression de l'activateur de transcription PrfA qui contrôle notamment l'expression de l'internaline, ce qui facilite la pénétration des germes et leur translocation à travers la barrière intestinale.
- 228 A un stade plus avancé de l'invasion de l'hôte, la bactérie va se trouver captée par les macrophages et/ou pénétrer dans les hépatocytes, et la perception des signaux spécifiques à cette position intracellulaire va déclencher la synthèse des protéines de stress, en même temps que vont s'exprimer l'ensemble des gènes de virulence activés par PrfA, dont le gène de structure de la listériolysine O, facteur clé de pathogénicité.
- 229 Quel que soit le niveau considéré, la virulence du germe est susceptible d'être activée ou réprimée. Deux questions se posent alors.
- 230 Comment le signal environnemental est-il perçu et transmis ? Il est de plus en plus évident que l'on puisse y répondre en transposant le modèle déjà connu chez d'autres bactéries pathogènes, celui de la transduction à deux composants. Dans ce système, un capteur membranaire, qui est en général une protéine kinase, perçoit le signal et le transmet à un activateur de transcription, régulateur positif ou négatif, selon le cas, de la transcription des gènes de virulence, qui interagit directement avec l'ADN en amont du promoteur de ces gènes. Deux systèmes fonctionnant sur ce principe ont du reste déjà été décrits, l'un contrôlant la chimiotaxie (Dons *et al.* 1994), et l'autre impliqué dans la tolérance au stress acide et alcoolique (et la virulence) de *L. monocytogenes* (Cotter *et al.* 1999). Enfin récemment Brehm *et al.* (1999) ont identifié un gène (locus *bvr*) dont l'inactivation abolit la répression des facteurs de virulence par le cellobiose. Le produit de ce gène pourrait être le capteur du système de transduction du signal.
- 231 La réponse au signal est-elle de type « tout ou rien », ou est-elle modulable ? Rien ne permet pour l'instant de répondre avec certitude à cette question. Il a déjà été mentionné plus haut qu'aucune corrélation n'avait pu être établie entre le niveau de production de listériolysine O et la virulence des souches de *L. monocytogenes*. L'inoculation expérimentale à la souris fournit des DL50 moyennes comprises entre 10⁴ et 10⁶ selon les souches, ce qui semble indiquer des différences de virulence intrinsèque parmi les souches de *L. monocytogenes*. Mais le modèle souris n'est pas nécessairement transposable à l'homme. Pour une

souche donnée, l'expression de la virulence va dépendre essentiellement des paramètres environnementaux, c'est-à-dire des réactions de défense de l'hôte (importance du statut immunologique) mais aussi, selon toute vraisemblance, de la composition du bol alimentaire durant le transit intestinal (teneur en cellobiose et autres -glucosides).

- 232 La culture à basses températures (4°C) pourrait augmenter la virulence des *L. monocytogenes*, (Czuprinsky *et al.* 1989 ; Stephens *et al.* 1991), toutefois ces résultats n'ont jamais été confirmés.

SECTION G : RELATION DOSE-RÉPONSE

233 *La relation dose-réponse pour L. monocytogenes est encore inconnue. Cependant, c'est un point majeur de l'estimation quantitative du risque.*

Question n°38 : Que sait-on des expérimentations animales ?

- Chez les non-primates ?

234 Notermans *et al.* (1998) ont tenté de trouver de façon expérimentale la cause de la faible incidence de listériose chez l'homme. Des calculs permettent de montrer le décalage entre l'exposition régulière des consommateurs à *L. monocytogenes* et la faible incidence de listériose reportée. Ces calculs sont réalisés à partir de données observées, relatives à la contamination et à la consommation de certains produits prêts à consommer. Dans un deuxième temps, les auteurs tentent d'expliquer ce décalage à partir d'expériences réalisées sur des souris. Diverses souches de *L. monocytogenes* ont été testées dont la plupart se sont révélées virulentes. Ainsi l'hypothèse d'atténuation de la virulence de certaines souches ne semble pas pouvoir expliquer le décalage entre la forte exposition humaine et la faible incidence. Par contre, une protection non adaptative par la barrière intestinale a été mise en évidence, ainsi qu'une protection adaptative par le système immunitaire. Il a aussi été montré que les quelques souches à virulence atténuée restaient aussi efficaces que les autres pour générer chez l'hôte une protection immunitaire contre la listériose. L'emploi de souches de collection par Notermans ne doit pas être oublié lors de l'interprétation de ce travail.

- Chez les primates non-humains ?

235 Il n'y a pas d'étude utilisable pour rechercher la loi dose-réponse chez les primates non-humains.

Question n°39 : Quelle connaissance est extraite des épidémies ?

236 Les enquêtes rétrospectives sur des cas d'épidémies conduisent à évaluer la quantité de germes présents dans l'aliment incriminé après l'apparition des symptômes chez les consommateurs. Les enquêtes sont le plus souvent difficiles à conduire, mais peuvent être d'une réelle utilité pour des bactéries non psychrotrophes à durée d'incubation courte, pour lesquelles la multiplication entre le moment de l'ingestion et la date de l'analyse est négligeable. Au contraire, pour des bactéries comme *L. monocytogenes*, du fait d'une incubation généralement longue, et d'une multiplication possible au froid, la densité bactérienne dans l'aliment incriminé est difficile à établir (Goulet *et al.* 1998b).

- Résultats des enquêtes réalisées sur les produits incriminés dans les épidémies (McLauchlin 1995)

237 Les résultats enregistrés lors des différentes épidémies (**Tableau XII**), font état de niveaux de contamination des produits incriminés supérieur à 10^2 *L. monocytogenes/g* d'aliment. Les résultats de l'épidémie américaine de 1998 sembleraient indiquer qu'il peut être beaucoup plus faible. Cependant, ces enquêtes ne font pas le lien entre l'immuno-compétence des consommateurs, la dose ingérée et les symptômes décrits. Il n'est donc pas possible, sur la base de ces informations, de définir de manière générale une relation dose-réponse.

Tableau XII Épidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays (au 01/07/00)

Pays	Année	Nombre de patients	Véhicule	Niveau de contamination (UFC/g)*	Référence
Canada	1980	41	Coleslaw (chou)		Schlech <i>et al.</i> 1983
USA	1983	49	lait pasteurisé		Fleming <i>et al.</i> 1985
USA	1985	> 142	Fromage à pâte molle « mexican style »	10 ³ -10 ⁴ D	Linnan <i>et al.</i> 1988
Suisse	1983-87	122	Fromage à pâte molle « Vacherin »	10 ⁴ -10 ⁶ D	Bille 1990
Royaume Uni, Irlande	1987-89	> 350	Pâté	10 ² -10 ⁶ D	McLauchlin <i>et al.</i> 1991
USA	1989	10	Crevettes		Riedo <i>et al.</i> 1994
Australie	1990	9	Pâté	10 ³ D et C	Kittson 1992
France	1992	279	Langue de porc en gelée Charcuterie à la coupe	10 ⁴ -10 ⁶ D, < 100	Goulet <i>et al.</i> 1993 Rocourt <i>et al.</i> 1993
Nouvelle Zélande	1992	2	Moules fumées		Brett <i>et al.</i> 1998
France	1993	38	Rillettes	10 ¹ -10 ³ D 10 ⁴ C	Goulet <i>et al.</i> 1998a Goulet <i>et al.</i> 1998b
Suède	1994-95	9	Truite « gravad »	10 ² -10 ⁶ D	Ericsson <i>et al.</i> 1997
France	1995	36	Fromage à pâte molle « Brie »		Goulet <i>et al.</i> 1995 Vaillant <i>et al.</i> 1998
France	1997	14	Fromage à pâte molle « Pont l'Évêque », « Livarot »		Jacquet <i>et al.</i> 1998
France	1999	3	Fromage à pâte molle type « Epoisses »		Non publié
USA	1998-99	101	Hot dog, « deli meat »	< 0,3 D et C	Mead 1999
Finlande	1999	18	Beurre	10 ¹ -10 ⁴ D et C	Lyytikäinen <i>et al.</i> 1999
France	1999	10	Rillettes	<10 P 10 ³ C et 10 ⁶ C	De Valk <i>et al.</i> 2000
France	1999-2000	32	Langue de porc en gelée Charcuterie		Non publié

*P : prélèvement à la production, produits non déconditionnés ;
D : prélèvement à la distribution, produits non déconditionnés ;
C : prélèvement chez le consommateur, produits déconditionnés.

- Détermination de la dose infectante à l'aide de volontaires humains (Ward *et al.* 1986)

238 Cette méthode a été éprouvée pour estimer la relation dose-réponse pour une infection à Rotavirus, mais est éthiquement contestable et difficilement envisageable pour des infections plus graves à *Salmonella* ou plus encore à *L. monocytogenes*.

- Détermination de la dose infectante à l'aide de l'interrogation d'experts

239 Ces méthodes fréquemment utilisées dans les pays Anglo-Saxons, consistent à réunir ou à interroger à distance, des experts reconnus d'une maladie et à leur proposer de répondre à un questionnaire relatif à l'établissement de la relation dose-réponse. Le traitement statistique approprié des données permet d'obtenir une réponse. Cette méthode est peu précise dans le cas des relations dose-réponse, notamment en raison du faible nombre de données dont disposent les experts pour étayer leurs réponses. De plus, le choix des experts est particulièrement déterminant et peut être entaché de biais. Parmi les méthodes qui peuvent être citées, la méthode Delphi (Henson 1995) est fréquemment utilisée. La « judgment-encoding methodology » (chiffage d'un avis d'expert), qui permet la détermination pour chaque type de population de la gravité en fonction de la dose ingérée a été récemment employée pour déterminer la relation dose-réponse pour *Campylobacter*, *L. monocytogenes*, et *Salmonella* (Martin *et al.* 1995).

240 Ces méthodes sont scientifiquement contestables.

- Evaluation de la loi dose-réponse pour *L. monocytogenes*, à partir de données d'épidémiologie

241 Buchanan *et al.* (1997) ont proposé une méthode d'évaluation de la loi dose-réponse utilisant les données relatives au nombre de cas de listérioses déclarées chez l'homme dans un pays, à la distribution des concentrations de *L. monocytogenes* dans un produit fréquemment contaminé et à la quantité et la fréquence de consommation de cet aliment. Les auteurs émettent l'hypothèse que la loi régissant la courbe

dose réponse est une loi exponentielle et calculent, à partir des données précédentes, le paramètre de cette loi, en supposant que seules les personnes immunodéprimées (estimée dans l'exemple à 20% de la population totale) sont susceptibles de développer une listériose. Les calculs réalisés sont très simples, et les auteurs précisent que la méthode proposée pourrait être améliorée par utilisation de simulations de type « Monte Carlo ». Un exemple est traité à partir de données épidémiologiques recueillies en Allemagne. Dans cet exemple, des données moyennes relatives à la consommation de saumon fumé sont utilisées (20 portions de 50 g consommées par habitant et par an en moyenne), et il est supposé, à titre de démonstration, que tous les cas de listériose recensés sont liés à la consommation de ce produit. Cette approche reste théorique, floue, et très largement discutable.

SECTION H : ÉPIDÉMIOLOGIE

Question n°40 : Quelles sont les connaissances épidémiologiques de la listériose chez l'homme ?

- Quel est le système de surveillance de la listériose en France ?

242 On considère comme un cas de listériose un patient chez lequel un prélèvement d'un site habituellement stérile a donné lieu à un isolement de *L. monocytogenes*.

243 En France, la listériose est une maladie à Déclaration Obligatoire (DO) conformément à l'article L.12 du Code de la Santé Publique (Décret n°98-69 du 13 mars 1998). Tout cas de listériose humaine défini par l'isolement de *L. monocytogenes* doit être déclaré à la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS). Une fiche de déclaration est transmise au Médecin Inspecteur de Santé Publique (MISP) de la DDASS qui la valide et la transmet à l'Institut de Veille Sanitaire (InVS). Le MISP est également chargé de faire compléter un questionnaire sur les aliments consommés par le patient au cours des 2 mois précédant sa maladie (circulaire DGS/VS n°98/240 du 15 avril 1998) et de s'assurer que la souche de *L. monocytogenes* a bien été envoyée au Centre National de Référence (CNR) des *Listeria* à l'Institut Pasteur de Paris pour typage. Les informations figurant sur la fiche de DO permettent de connaître le département de résidence du patient, son âge, la forme clinique de la maladie, l'existence éventuelle d'une pathologie sous-jacente au moment du diagnostic de la listériose et l'évolution de la maladie au moment de la déclaration (évolution favorable, incertaine, décès). En 1999, 250 cas ont été déclarés aux DDASS.

244 La surveillance de la listériose est également assurée par le CNR des *Listeria* qui centralise et caractérise les souches de *L. monocytogenes* provenant des laboratoires de microbiologie. Le recrutement en souches du CNR, autrefois basé uniquement sur le volontariat, s'est considérablement amélioré depuis 1992. Les données publiées avant et après 1992 sont donc difficilement comparables. Chaque souche est accompagnée d'une fiche d'information remplie par le laboratoire d'origine. Cette fiche d'information est transmise par le CNR à l'InVS dès réception de la souche. La confrontation des deux systèmes permet de repérer des cas qui n'ont pas été déclarés aux DDASS. Ainsi en 1999, 21 cas pour lesquels la souche avait été envoyée au CNR n'ont pas fait l'objet d'une DO de la part du clinicien. En 1999, 271 cas ont été recensés à partir des deux systèmes d'où une incidence en France métropolitaine, de 4,5 cas/million d'habitants.

245 Un certain nombre de cas de listériose échappent à ces deux systèmes de surveillance. Ces cas peuvent être, notamment, les cas sans isolement microbiologique comme certaines rhombencéphalites ou méningites avec traitement antibiotique antérieur, les avortements précoces qui n'ont pas donné lieu à une recherche microbiologique ou des femmes enceintes fébriles qui n'ont pas eu d'hémoculture. Cela peut être également des cas ayant donné lieu à un isolement, mais non déclarés par les médecins et dont les souches n'ont pas été transmises au CNR. Cette situation est probablement plus fréquente pour les patients suivis dans des structures privées dont les laboratoires n'ont pas tous l'habitude d'envoyer leurs souches au CNR.

246 Il existe une autre source d'information sur la listériose humaine en France, à partir d'un réseau de laboratoires de microbiologie hospitaliers (réseau EPIBAC) qui recense les bactériémies et les méningites à *L. monocytogenes* depuis 1987. Son intérêt principal est de donner des estimations en tenant compte des laboratoires non déclarant et de suivre l'évolution de l'incidence de la maladie sur plus de 10 ans avec un système dont la méthodologie est restée inchangée d'une année sur l'autre. Les données estimées sont donc comparables d'une année sur l'autre, mais ne prennent en compte que les cas répondant aux critères d'inclusion (souches isolées dans le sang ou le liquide céphalo rachidien).

- Quels sont les groupes à risque de listériose ? Quelle est la répartition des différentes formes cliniques de la listériose ?

247 Les groupes à risque de listériose sont les femmes enceintes et leur nouveau-né ainsi que les sujets ayant une pathologie ou un traitement entraînant une immunosuppression. En 1999, les femmes enceintes et leur nouveau-né (forme materno-néonatales) représentent 24 % des cas identifiés par la DO et/ou le CNR. Les sujets ayant une pathologie ou un traitement favorisant la listériose représentent 59 % des cas (soit 76 % des formes non materno-néonatales) et les sujets sans facteur prédisposant pour la listériose 17 % des cas.

248 Dans l'étude effectuée par Goulet et Marchetti (1996) sur 225 cas de listériose non-périnatale en France en 1992, 71 % ont été diagnostiqués chez des patients souffrant d'une pathologie ou subissant un traitement favorisant la listériose : 34 % avait une immunodépression sévère, 37 % avait un facteur prédisposant tel

que dialyse, diabète sucré, alcoolisme, insuffisance hépatique ou cancer sans thérapeutique immunosuppressive. Parmi les personnes sans terrain, l'infection du système nerveux central était la forme la plus fréquente (80 %) tandis que le groupe des sujets ayant une pathologie ou un traitement favorisant la listériose développait plus fréquemment une bactériémie (52 %). A partir de cette étude, Marchetti (1996) a classé ces pathologies en fonction de leur niveau de risque par rapport à la population générale de sujets de moins de 65 ans n'ayant pas de terrain particulier connu au moment du diagnostic de leur listériose. Il a pu ainsi identifier 3 groupes avec un niveau de risque décroissant :

- un groupe où le risque de listériose est multiplié par environ 1000 : transplantés, hémopathies et SIDA ;
- un groupe où le risque est multiplié par environ 100 : cancers solides, hépatopathies et hémodialysés ;
- un groupe avec un risque multiplié par 20 : diabétiques et alcooliques.

249 Les sujets âgés de plus de 65 ans sans pathologie ou traitement favorisant la listériose ont un risque multiplié par 7. Ce risque croît avec l'âge : il est multiplié par 14 chez les plus de 75 ans.

250 Dans cette étude, la létalité de la listériose était de 24 % ce qui est comparable aux autres données publiées. La létalité est plus forte chez les sujets avec un terrain à risque (30 %) que chez les autres (7 %). Des séquelles neurologiques ont été rapportées chez 12 % des patients ayant présenté une forme neuroméningée.

- Que sait-on des fluctuations saisonnières ?

251 A la différence de certaines autres infections transmises par les aliments, il n'existe pas de saisonnalité mensuelle qui apparaisse nettement en matière de listériose humaine. La distribution des cas par trimestre montre toutefois une augmentation d'importance variable pour le 3^{ème} trimestre pour les pays industrialisés de l'hémisphère Nord, y compris la France (Rocourt *et al.* 1997).

- Que sait-on de l'incidence de la listériose dans les autres pays ?

252 Un calcul d'incidence peut être réalisé pour les pays qui disposent d'un système de surveillance permettant de recenser les cas au niveau national. Certains pays comme les Etats-Unis d'Amérique ont une surveillance active sur quelques Etats permettant de calculer une incidence extrapolée à l'ensemble de la population du pays (cf. paragraphe 256).

253 Selon les pays, le recensement des cas est soit fondé sur les déclarations de cas par les médecins, soit sur le nombre de souches de *L. monocytogenes* isolées par les laboratoires de leur pays, soit une combinaison des deux sources d'information comme en France. Certains pays ne recensent que certaines formes cliniques de listériose : méningites ou infections néo-natales.

254 De nombreux pays ont un laboratoire, Centre de Référence des *Listeria*, qui, soit centralise la plupart des souches isolées dans leur pays (comme par exemple les pays scandinaves, la Grande-Bretagne, la Belgique et la Suisse), soit reçoit des souches de certains laboratoires hospitaliers avec lesquels ils a des relations privilégiées (Allemagne). Pour ces derniers, il est impossible de donner une estimation d'incidence sauf si l'on peut connaître le nombre d'habitants qui ont recours à ces laboratoires.

255 Un répertoire des systèmes de surveillance existant en 1991 et 1992 dans différents pays a été publié en 1997 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Rocourt *et al.*, 1997). L'analyse des données des pays qui ont un système de surveillance permettant de calculer une incidence, montre que dans la majorité de ces pays, l'incidence se situe entre 2 et 4 cas/million d'habitants et qu'il ne semble pas exister de différences importantes entre les pays. Très peu de cas sont rapportés par les pays en développement. Il n'est pas possible de déterminer si ce faible nombre de cas rapportés a pour origine une réelle moindre incidence, ou un défaut de diagnostic et/ou de moyen de surveillance. La nature des aliments fréquemment consommés ou encore la faible fréquence d'utilisation de la chaîne du froid à tous les stades de la chaîne alimentaire, voire également la faible proportion de certaines populations à risque, pourraient expliquer une quasi-absence de cas dans ces pays.

- Quelle est l'évolution de l'incidence de la listériose au cours des dernières années ?

256 Une diminution de l'incidence annuelle est observée depuis quelques années (Rocourt *et al.*, 2000). Aux USA, elle est passée de 7,7 à 4,2 cas par million d'habitants entre 1990 et 1993 et depuis cette date, l'incidence oscille entre 3,7 et 5,8. Il convient de noter d'une part que ces résultats ont été obtenus avec un système de surveillance actif et, d'autre part, que ces données ont été extrapolées pour l'ensemble des USA à partir de celles obtenues dans 5 Etats (Tappero *et al.* 1995). En Grande-Bretagne, après la nette diminution consécutive à la fin de l'épidémie en 1987-1989, l'incidence demeure faible, comprise entre 1,6 et 2,5 cas par million d'habitants.

257 En France, plusieurs enquêtes effectuées en 1984, 1986, 1987 et 1988 auprès de l'ensemble des laboratoires hospitaliers (Goulet *et al.* 1986, 1987, 1989, 1990 ; Goulet et Brohier 1989) avaient montré que l'incidence variait au cours de ces années entre 11 et 14 cas/million d'habitants. Selon les données du CNR

et de la DO, l'incidence actuelle est autour de 4 cas par million d'habitants. L'analyse des données du réseau EPIBAC montre également que l'incidence des bactériémies et des méningites à *Listeria* a été réduite d'un facteur 3,5 en 10 ans entre 1987 et 1997 (Anonymous 1999a) (**Figure 2**). La baisse observée par le réseau EPIBAC ne peut pas être expliquée par un changement du système de surveillance : les modalités de fonctionnement du réseau ont été constantes, et les estimations annuelles tiennent compte du nombre de laboratoires participants. Comme en Grande-Bretagne, cette diminution est associée à une forte décroissance du nombre de cas de listériose périnatale (154 cas en 1992 contre 47 en 1998) (Jacquet *et al.* 1999). De même, si l'on compare les données recueillies au cours de l'enquête effectuée en 1987 auprès des laboratoires et au cours de l'étude de tous les cas sporadiques réalisée en 1997, on constate que cette diminution d'incidence a été observée surtout chez les sujets sans pathologie sous-jacente et chez les femmes enceintes (Goulet et Marchetti 1996). En conséquence, les sujets avec une pathologie ou un traitement favorisant la listériose représente maintenant le groupe majoritaire.

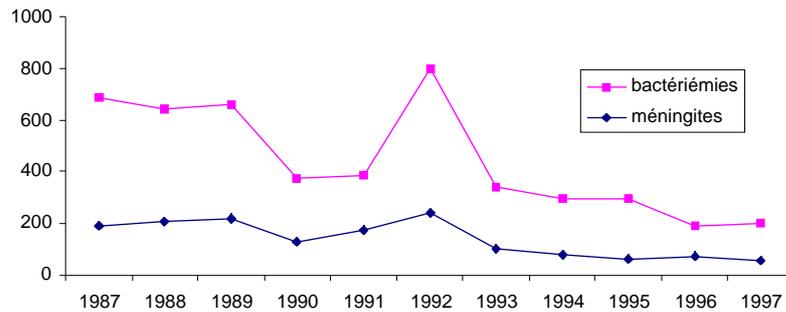


Figure 2 Evolution annuelle du nombre de bactériémies et de méningites à *Listeria monocytogenes* (Source : réseau EPIBAC, Anonymous 1999a)

- Que sait-on des portages humains ?

258 De nombreuses études ont été réalisées le plus souvent dans des populations particulières (personnel d'abattoir, d'usine agro-alimentaire, patients hospitalisés, femmes enceintes, etc.) Dans la revue de la littérature faite par Slutsker et Schuchat (1999), 22 études ont été recensées. Dans la majorité des cas, le portage dans les selles est inférieur ou égal à 5 %. La notion de portage n'est pas caractérisée avec certitude : s'agit-il d'un passage transitoire intestinal ou d'un véritable portage à long terme ?

- Qu'est ce qu'une épidémie de listériose ? Pourquoi les détecter et réaliser des investigations ?

259 On qualifie d'épidémie un groupement temporel d'au moins deux cas de listériose dû à des souches de *L. monocytogenes* ayant les mêmes caractéristiques c'est-à-dire non différenciables par des méthodes discriminantes de typage (lysotypie ou PFGE). L'existence de plusieurs malades infectés par la même souche de *L. monocytogenes* suggère qu'ils ont été contaminés par le même aliment ou une source commune. L'aliment en cause peut être encore produit, distribué ou présent chez le consommateur. Compte tenu de la gravité de la maladie (20 à 30 % de décès) il est important d'éviter de nouveaux cas. L'investigation s'attachera alors à identifier le produit contaminé à l'origine de ces cas afin de définir les mesures les plus aptes à éviter de nouveaux cas. L'investigation permet également d'identifier les mécanismes qui ont abouti à la survenue d'une épidémie et permet ainsi d'agir à leur niveau pour éviter la survenue de nouvelles épidémies.

- Quel est le schéma actuel d'une investigation d'épidémie en France ?

260 En France, le typage des souches de *L. monocytogenes* qui permet d'identifier une épidémie de listériose est assurée par le CNR des *Listeria* (Institut Pasteur, Paris) qui centralise et caractérise les souches de *L. monocytogenes* provenant des laboratoires de microbiologie. Lorsque le CNR détecte parmi les souches isolées chez l'homme une augmentation inhabituelle du nombre de souches ayant les mêmes caractéristiques, il déclenche une alerte. Une investigation est alors menée par une cellule de coordination composée de représentants de l'InVS, du CNR, de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAI) du Ministère de l'Agriculture, de la Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des fraudes (DGCCRF) et de la Direction Générale de la Santé (DGS).

261 Par l'intermédiaire de la DO, l'InVS dispose pour chaque cas déclaré, lorsque l'interrogatoire a été possible, d'un questionnaire portant sur l'alimentation du patient au cours des 2 mois précédant le début des symptômes. Les informations concernant les patients identifiés par le CNR sont alors confrontées afin de trouver des éléments communs (produits, marques, lieux d'achat, chaîne de distribution, etc.). L'hypothèse générée par cette analyse est ensuite testée par une enquête cas-témoin. Elle consiste à comparer les

fréquences de consommation des aliments par les patients de l'épidémie aux fréquences de consommation d'une population témoin. L'analyse statistique de ces informations permet d'identifier épidémiologiquement des aliments dont la consommation pourrait être liée à l'épidémie.

- 262 Dans le même temps, le CNR recherche dans sa base de souches d'origine alimentaire, constituée à partir des souches adressées pour caractérisation par des laboratoires vétérinaires et d'hygiène alimentaire, les souches présentant les mêmes caractéristiques que les souches humaines.
- 263 Lorsqu'un produit est suspecté, une analyse des circuits de distribution est effectuée par les agents des Directions Départementales des Services Vétérinaires (DDSV) et des Directions Départementales de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes (DGCCRF) afin d'identifier un établissement de production. De plus, ces agents réalisent des prélèvements de ce produit à la distribution et dans les établissements de production lors de visites d'inspection.
- 264 L'introduction de la DO et du questionnaire alimentaire systématique du patient a permis de renforcer l'efficacité du système et d'accélérer considérablement les investigations épidémiologiques à mettre en œuvre en cas d'alerte donnée par le CNR. Lors des épidémies récentes, le système interactif a permis d'identifier rapidement l'aliment en cause permettant la mise en œuvre de mesures de gestion du risque et de limiter le nombre de cas (De Valk *et al.* 2000)
- Qu'est-ce qu'un aliment à risque ? Quels sont les aliments mis en cause dans les listérioses humaines ?

265 Un aliment à risque est un aliment permettant la croissance de *L. monocytogenes* et consommé sans avoir été chauffé suffisamment pour détruire les *Listeria*. Les aliments tout particulièrement concernés sont les produits à conservation longue comme certains fromages et certains produits de charcuterie.

→ *Aliments contaminés à la distribution*

- 266 Afin d'avoir des informations sur la contamination en France, des produits réputés sensibles, la DGCCRF a mis en place depuis 1993 des plans de surveillance. En 1993-1996 (Note d'information n°1998-44 de la DGCCRF ; Anonymous 1998a), *L. monocytogenes* a globalement été isolée dans 10 % des prélèvements réalisés (4500 par an).
- 267 La fréquence de contamination varie entre 5 et 16 % selon les produits. Le niveau de contamination est globalement faible : plus de 90 % des produits contaminés ont moins de 100 *L. monocytogenes/g*, exception faite des produits laitiers (**Tableau XIII**). Il existe une hétérogénéité de la contamination à l'intérieur de chaque groupe de produit (**Tableau XIV**). Parmi les produits carnés, les charcuteries consommées en l'état sont beaucoup moins contaminées que la viande ou la charcuterie crue hachées ; parmi les fromages, les fromages au lait cru sont plus fréquemment contaminés que les fromages pasteurisés.

Tableau XIII Niveau de contamination par produit - Plans de surveillance de la DGCCRF (1993-1996)

	Pourcentage du nombre total de prélèvements						Pourcentage du nombre de prélèvements contaminés				
	absence	<100	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ -10 ⁵	>10 ⁵	<100	10 ² -10 ³	10 ³ -10 ⁴	10 ⁴ à-10 ⁵	>10 ⁵
Produits carnés	84,0	14,8	0,8	0,3	0,1	0,1	92,7	4,9	1,8	0,3	0,3
Produits laitiers	95,3	2,9	0,7	0,5	0,3	0,2	62,7	15,7	11,4	6,0	4,2
Pâtisseries	95,7	4,0	0,3	0,1	0	0	91,8	6,1	2,0	0	0
Végétaux	95,5	4,2	0,2	0,1	0	0	93,0	4,9	1,4	0,7	0
Produits de la mer	89,8	9,7	0,4	0,1	0	0	94,9	3,7	1,1	0,4	0

Tableau XIV Pourcentage de produits contaminés par *L. monocytogenes* à la distribution – Plans de surveillance de la DGCCRF (1993-1996)

Type de produit	Pourcentage de produits contaminés	Type de produit	Pourcentage de produits contaminés
Produits carnés	16 %	Produits laitiers	5 %
<i>charcuterie crue hachée</i>	45 %	<i>Fromages au lait cru</i>	8 %
<i>viande hachée</i>	36 %	croûte fleurie	14 %
<i>charcuterie consommée en l'état</i>	15 %	croûte lavée	10 %
Produits de la mer	10 %	<i>Fromages au lait pasteurisé</i>	3 %
<i>Saurisserie fumée</i>	16 %	croûte fleurie	4 %
		croûte lavée	5 %

268 En plus des aliments considérés comme théoriquement à risque du fait de leur contamination à la distribution, on considère comme particulièrement sensibles les aliments ayant été à l'origine de cas de listérioses humaines. Les différentes épidémies publiées ainsi que plusieurs études sur les cas sporadiques de listériose ont permis d'identifier une grande variété de produits à l'origine de cas de listériose chez l'homme.

- Quels ont été les aliments mis en cause lors des principales épidémies ?

269 En France, l'investigation de 7 épidémies entre 1992 et le 1^{er} semestre 1999 a mis en cause plusieurs aliments : des produits de charcuterie fabriqués industriellement dans les épidémies de 1992 (langue de porc en gelée), 1993 (rillettes), 1999 (rillettes) et 1999-2000 (langue de porc en gelée), et des fromages à pâte molle au lait cru dans les épidémies de 1995 (« Brie de Meaux »), 1997 (« Pont l'Evêque » et « Livarot ») et 1999 (fromage à pâte molle type « Epoisses », non conforme à l'Appellation d'Origine Contrôlée).

270 Lors des principales épidémies survenues dans d'autres pays, rapportées dans la littérature, ont été mis en cause des produits laitiers (5 fois), des produits de charcuterie ou carnés (3 fois), des produits de la mer (3 fois) et des produits végétaux (2 fois) (**Tableau XV**).

Tableau XV Épidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays (au 01/07/00)

Pays	Année	Nombre de patients	Véhicule	Niveau de contamination (UFC/g)*	Référence
Canada	1980	41	Coleslaw (chou)		Schlech <i>et al.</i> 1983
USA	1983	49	lait pasteurisé		Fleming <i>et al.</i> 1985
USA	1985	> 142	Fromage à pâte molle « mexican style »	10 ³ -10 ⁴ D	Linnan <i>et al.</i> 1988
Suisse	1983-87	122	Fromage à pâte molle « Vacherin »	10 ⁴ -10 ⁶ D	Bille 1990
Royaume Uni, Irlande	1987-89	> 350	Pâté	10 ² -10 ⁶ D	McLauchlin <i>et al.</i> 1991
USA	1989	10	Crevettes		Riedo <i>et al.</i> 1994
Australie	1990	9	Pâté	10 ³ D et C	Kittson 1992
France	1992	279	Langue de porc en gelée Charcuterie à la coupe	10 ⁴ -10 ⁶ D, < 100	Goulet <i>et al.</i> 1993 Rocourt <i>et al.</i> 1993
Nouvelle Zélande	1992	2	Moules fumées		Brett <i>et al.</i> 1998
France	1993	38	Rillettes	10 ¹ -10 ³ D 10 ⁴ C	Goulet <i>et al.</i> 1998 a Goulet <i>et al.</i> 1998 b
Suède	1994-95	9	Truite « gravad »	10 ² -10 ⁶ D	Ericsson <i>et al.</i> 1997
France	1995	36	Fromage à pâte molle « Brie »		Goulet <i>et al.</i> 1995 Vaillant <i>et al.</i> 1998
France	1997	14	Fromage à pâte molle « Pont l'Evêque », « Livarot »		Jacquet <i>et al.</i> 1998
France	1999	3	Fromage à pâte molle type « Epoisses »		Non publié
USA	1998-99	101	Hot dog, « deli meat »	< 0,3 D et C	Mead 1999
Finlande	1999	18	Beurre	10 ¹ -10 ⁴ D et C	Lyytikäinen <i>et al.</i> 1999
France	1999	10	Rillettes	<10 P 10 ³ C et 10 ⁶ C	De Valk <i>et al.</i> 2000
France	1999-2000	32	Langue de porc en gelée Charcuterie		Non publié

*P : prélèvement à la production, produits non déconditionnés ;
D : prélèvement à la distribution, produits non déconditionnés ;
C : prélèvement chez le consommateur, produits déconditionnés.

271 Récemment, 3 épisodes de TIAC à gastro-entérites causées par *Listeria* ont été rapportés mettant en cause des aliments fortement contaminés : salade de riz (Salamina *et al.* 1993), lait chocolaté (Dalton *et al.* 1997), farine de maïs (Aureli *et al.* 2000). Très peu d'informations sont disponibles sur ce dernier épisode qui n'a pas été publié à ce jour et qui aurait concerné près d'un millier de cas.

- Quels sont les aliments mis en cause par les études sur les facteurs de risque des listérioses sporadiques ?

272 Des études sur les facteurs de risque des listérioses sporadiques ont été conduites aux USA (Schwartz *et al.* 1988 ; Pinner *et al.* 1992 ; Schuchat *et al.* 1992) au Royaume Uni (Hall *et al.* 1995), au Danemark (Jensen *et al.* 1994) et en France (De Valk *et al.* 1998) (**Tableau XVI**).

273 Les aliments mis en cause dans ces études sont également variés et de nature sensiblement différente des aliments mis en cause lors des épidémies (sauf en France). Dans l'étude française, en 1997, 49 % des cas sporadiques étaient attribuables à la consommation de fromages à pâte molle (De Valk *et al.* 1998).

Tableau XVI Aliments mis en cause par les études de type « cas-témoins » sur les facteurs de risque des listérioses sporadiques

Pays	Année	Nombre de cas/ Nombre de témoins	Aliments associés avec la maladie	Référence
USA	1986-1987	82/239	Hot-dog non réchauffé Poulet insuffisamment cuit	Schwartz <i>et al.</i> 1988
USA	1988-1990	165/376	Fromages à pâte molle, Produits du rayon traiteur	Schuchat <i>et al.</i> 1992 Pinner <i>et al.</i> 1992
Danemark	1989-1991	50/40	Lait cru, pâté	Jensen <i>et al.</i> 1994
Grande Bretagne	1990-1992	124/459	Poulet acheté cuit, Crustacés	Hall <i>et al.</i> 1995
France	1997	120/240	Fromages à pâte molle	De Valk <i>et al.</i> 1998

- Sur quelle base apprécier la probabilité d'exposition de la population ?

274 Pour estimer la probabilité d'exposition de la population, il faut connaître la nature des aliments consommés, la fréquence et l'importance de contamination de ces différents aliments, la fréquence de consommation et la quantité consommée de chacun de ces aliments. Cette probabilité doit être calculée pour la population totale, mais également pour les populations les plus sensibles, ce qui nécessite de connaître les habitudes alimentaires (fréquence et quantité) de ces populations (habitudes différentes pour un sujet sain, pour une femme enceinte et un cancéreux sous immunodépresseur). Elle doit aussi être évaluée pour différents niveaux de contamination en prenant en compte différents types d'aliments, en particulier les aliments les plus à risque pour la transmission de *Listeria*, c'est-à-dire les plus à même de contenir des *Listeria* viables ; l'aliment à haut risque typique étant un aliment transformé avec des conditions environnementales (pH, a_w , température) favorisant la multiplication de *L. monocytogenes* avec une longue durée de conservation et consommé en l'état (sans être réchauffé).

- Peut-on estimer une probabilité d'exposition moyenne ?

275 Il est théoriquement possible d'estimer une probabilité d'exposition moyenne à différents niveaux de contamination pour la population totale et les populations sensibles pour différents types d'aliments, à condition de connaître la fréquence de contamination des aliments et les consommations moyennes (en fréquence ou en quantité) des populations étudiées.

276 Des probabilités d'exposition annuelle moyenne ont ainsi été estimées dans des études réalisées aux Etats-Unis (Hitchins 1995, 1996) et aux Pays-Bas (Notermans *et al.* 1998).

277 L'étude américaine a estimé la probabilité d'exposition annuelle moyenne aux Etats Unis à la fin des années 80 pour des aliments prêts à consommer (ne nécessitant pas de cuisson) considérés comme les plus à risque. Il s'agit d'une approche quantitative utilisant les données de contamination des aliments et les données de consommation. Le nombre moyen d'exposition par an et par personne a été estimé entre 10 et 100 pour une proportion d'aliments prêts à consommer représentant entre 2 et 20 % de la ration alimentaire totale.

278 L'étude hollandaise porte sur 4 grandes catégories de produits (produits carnés, produits de la pêche, fromages, salades) et utilise une approche fondée sur la fréquence de contamination et la fréquence de consommation de ces produits.

279 Les estimations provenant de ces études sont « grossières », mais elles suggèrent que la probabilité d'exposition à *L. monocytogenes* en particulier aux doses faibles est très importante et très supérieure à la fréquence de la maladie y compris dans les populations à risque.

280 Il existe en France des données qui permettraient de réaliser des études similaires à celles réalisées aux Etats Unis et aux Pays-Bas (avec les mêmes limites) :

- des données sur la fréquence de contamination des aliments prélevés à la distribution peuvent être obtenues à partir des plans de surveillance de la contamination par *L. monocytogenes* des aliments réputés sensibles de la DGCCRF (Pierre et Veit 1996) ; des données sur la contamination à la production des fromages fermiers ou industriels au lait cru peuvent également être obtenues grâce aux plans de surveillance de la contamination bactériologique des fromages fermiers ou industriels au lait cru la DGAI (Note de service DGAL/SDHA/N°97/N°8173 du 24/11/97).
- des données sur la consommation annuelle moyenne (quantité consommée par an et par personne) de la population générale pour 68 groupes d'aliments et 6 années (1980-1993) ont été publiées par l'Observatoire des Consommations Alimentaires (OCA) (Combril *et al.* 1997).
- très peu de données sont disponibles sur la consommation alimentaire des populations à risque. Une estimation des fréquences de consommation de la population à risque peut être obtenue à partir des

fréquences de consommation observées dans la population témoin interrogée lors d'une étude cas-témoin sur les facteurs de risque de listériose réalisée en 1997 par le RNSP.

- 281 Il est possible d'estimer la fréquence d'exposition à partir des données précédentes (**Tableau XVII ; Tableau XVIII et Tableau XIX**). Ces estimations sont des probabilités d'exposition moyenne qui ne reflètent qu'une situation moyenne. Dans la réalité, certaines personnes sont rarement exposées et ce à des doses faibles ; à l'opposé d'autres personnes sont plus fréquemment exposées à des doses fortes et toutes les situations intermédiaires existent. Dans une démarche d'analyse de risque, il serait nécessaire de prendre en compte toutes ces situations, en particulier les individus exposés souvent à des doses fortes chez lesquels la probabilité de survenue d'une listériose est la plus élevée. Une modélisation de la distribution des expositions en utilisant une méthode de type « Monte-Carlo » pourrait être utilisée. Il serait cependant nécessaire de connaître au préalable les distributions des concentrations de *L. monocytogenes* dans les aliments et la distribution de la consommation de ces aliments.

Tableau XVII Estimation de la fréquence d'exposition à des fromages à pâte molle à croûte fleurie contaminés par *L. monocytogenes* (> 100/g) dans la population générale. (méthode Hitchins 1995, 1996)

Nombre d'échantillons de 25g analysés*	Nombre d'échantillons contaminés*	Quantité moyenne nécessaire pour une contamination (g)	Quantité consommée** (g/personne/an)	Fréquence d'exposition (par personne et par an)
752	28	671	3128	4,7

* plans de surveillance de la DGCCRF 1993-1996 ; ** Observatoire des consommations alimentaires 1993

Tableau XVIII Estimation de la fréquence d'exposition à des produits contaminés par *L. monocytogenes* (> 100 UFC/g) dans la population à risque en France. (méthode Notermans *et al.* 1998)

Type d'aliment	Fréquence de contamination*	Fréquence de consommation ** (par personne et par an)	Fréquence d'exposition (par personne et par an)
Charcuteries cuites, Salaisons sèches	1,1 %	208	2,3
Fromages	2,0 %	266	5,3
Poissons fumés	2,0 %	9	0,2
Total			7,8

* plans de surveillance de la DGCCRF 1993-1996 ; ** Consommation des sujets à risque (population des témoins inclus dans l'étude cas sporadique InVS, 1997)

Tableau XIX Estimation de la fréquence d'exposition à des produits contaminés par *L. monocytogenes* (> 1000 UFC/g) dans la population à risque en France (méthode Notermans *et al.* 1998)

Type d'aliment	Fréquence de contamination*	Fréquence de consommation** (par personne et par an)	Fréquence d'exposition (par personne et par an)
Charcuteries cuites, Salaisons sèches	0,6 %	208	1,2
Fromages	1,2 %	266	3,2
Poissons fumés	0,7 %	9	0,06
Total			4,5

* Plan de surveillance de la DGCCRF 1993-1996 ; ** Consommation des sujets à risque (population des témoins inclus dans l'étude cas sporadique InVS, 1997)

Question n°41 : Quelles sont les connaissances épidémiologiques sur la listériose chez l'animal ?

- 282 On considère comme un cas de listériose, un animal qui présente des signes cliniques ou une mortalité brutale et chez lequel un prélèvement dans un site ou un organe habituellement stérile a permis l'isolement de *L. monocytogenes*. Le ou les prélèvements peuvent être effectués sur des animaux vivants (troubles oculaires ou génitaux, par exemple) ou sur des animaux morts (avortons, ou morts-nés, animaux ayant présentés des troubles méningo-encéphaliques par exemple). La listériose évolue de façon sporadique dans un troupeau, quelques animaux peuvent présenter des symptômes, certains guérissent, d'autres meurent, très souvent une seule analyse bactériologique est faite (particulièrement chez les ovins). Le cas peut être considéré comme un « cas-foyer ».
- 283 En France, en médecine vétérinaire, la listériose n'est pas une Maladie Réputée Légale Contagieuse (MRLC) ni une maladie à Déclaration Obligatoire (DO). Les cas sont mis en évidence par les laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux ou privés. Ce sont les vétérinaires praticiens et/ou les éleveurs qui ont le libre choix de demander ou non les analyses et la recherche de *L. monocytogenes*. Suivant les

départements les recherches peuvent être faites à la demande d'un Groupement de Défense Sanitaire (GDS) ou d'une entreprise, laitière le plus souvent, dans le cadre d'une campagne de dépistage systématique de différents agents infectieux lors d'avortements, de troubles nerveux, de mammites ou de portages asymptomatiques (dans un cheptel laitier particulier, par exemple). On peut observer de ce fait une disparité dans le nombre de cas diagnostiqués suivant les départements.

284 A ce jour, aucune structure ne centralise les cas ou les cas-foyers de listériose animale en France, ni les souches isolées par les différents laboratoires d'analyses vétérinaires publics ou privés. Une enquête effectuée en mai-juin 1999, portant sur l'année 1998 jusqu'au mois de juin 1999, auprès des laboratoires vétérinaires départementaux a permis d'avoir une estimation des cas ou cas-foyers répertoriés (**Tableau XX**).

- Quelles sont les espèces animales touchées ? Quelle est la répartition selon les formes cliniques ? (**Tableau XX**)

Tableau XX Cas ou cas-foyers répertoriés de listériose animale (à *L. monocytogenes*), en France, en 1998 jusqu'au mois de juin 1999 (428 cas-foyers) (Source : Laboratoires Vétérinaires Départementaux d'Analyses)

Espèces	Total	Avortements, Troubles génitaux	Encéphalites	Septicémies	Conjonctivites
Bovins	259	133	106	13	7
Ovins	108	14	90	4	
Caprins	32	8	24		
Autres espèces	29				
<i>Oiseaux domestiques et sauvages</i>	5			5	
<i>Equin</i>	1		1		
<i>Chevreaux</i>	10		10		
<i>Sanglier</i>	1			1	
<i>Lièvres et lapins</i>	11			11	
<i>Carnivore</i>	1				

285 Les sérogroupes trouvés dans ces cas répertoriés sont essentiellement des sérogroupes 1 et 4 (10 à 30 % du séro groupe 1 ; 70 à 90 % du séro groupe 4 suivant les laboratoires et les régions).

- Quelles sont les catégories animales à risque ?

286 Ce sont les femelles gestantes, les nouveaux-nés, ou les jeunes animaux à l'engraissement, plus rarement les adultes (hors reproduction) qui sont les plus sensibles.

287 Le mode de contamination est essentiellement alimentaire. *L. monocytogenes* est une bactérie répandue dans l'environnement, dans les sols et sur les plantes. Des facteurs de risques supplémentaires se retrouvent chez les animaux soumis à des régimes à base d'ensilages (mal préparés ou mal conservés) de végétaux divers. A un moindre degré, selon des informations non publiées des laboratoires vétérinaires départementaux et de vétérinaires praticiens, le risque serait augmenté chez les animaux qui pâturent sur des sols constamment retournés par des micro-mammifères sauvages (taupes, campagnols, « rats taupiers », etc.) (cf. section C).

288 Plusieurs facteurs concourent aussi à une forte exposition des animaux :

- des sols contaminés par un important apport de déjections éliminées par des porteurs sains ;
- les animaux eux-mêmes (Husu 1990 ; Bind et Delaval 1993 ; Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996) ;
- des apports extérieurs de lisiers, de fumiers, de fientes répétés trop souvent ;
- la présence importante de rongeurs ou de lagomorphes (Goret et Joubert 1976 ; Inoue *et al.* 1992 ; Bind et Delaval 1993 ; Stahl *et al.* 1996) ;
- le rôle vecteur de porteurs sains, d'un grand nombre d'oiseaux sauvages ou semi domestiques (Fenlon 1985 ; Weber *et al.* 1995a, 1995b ; Bouttefroy *et al.* 1997), espèces reconnues pour être des pourvoyeurs excréteurs de *Listeria* diverses.

289 Tous ces éléments concourent à une surcontamination des sols, des plantes (Welshimer 1968 ; Weis et Seeliger 1975 ; Jacquet *et al.* 1993), de leurs réservoirs de conservation et de leurs ensilages (Olson *et al.* 1953 ; Gray 1958a, 1960a, b ; Krüger 1963 ; Seeliger 1971 ; Nicolas *et al.* 1972, 1974 ; Goret et Joubert 1976 ; Gronstol 1979, 1980 ; Fenlon 1986 ; Gitter *et al.* 1986 ; Wilesmith et Gitter 1986 ; Bind et Delaval 1993 ; Sanaa 1994 ; Donald *et al.* 1995).

- 290 La pratique de plus en plus courante de stockage et de conservation des végétaux fermentés destinés à l'alimentation animale, particulièrement chez les bovins et ovins, a ainsi vu augmenter les cas de listérioses dans des ateliers d'animaux à production laitière ou à viande. La qualité des ensilages est essentielle et les erreurs de fabrication (pH trop élevé, broyage trop grossier des végétaux, aérobiose, présence de terre ou stockage en semi-enterré dans les sols, lessivage par des pluies, mauvaise protection par des bâches abîmées, etc.) sont à l'origine de la prolifération de la bactérie. Certains auteurs n'hésitent pas à écrire que l'utilisation d'ensilage augmente de 20 fois le risque de contamination du lait des tanks dans un troupeau, cette contamination étant plus fréquente par voie extramammaire (environnement) que par voie intramammaire (Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996). Cependant, les niveaux de contamination du lait sont plus élevés et plus durables lors de contaminations intramammaires que lors de contaminations extramammaires (Menard *et al.* 1992 ; Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996).
- 291 Les animaux dont l'état physiologique est bon pourront ingérer des quantités importantes de *Listeria* sans manifester de signes cliniques ; ils excréteront cependant de façon plus ou moins continue les germes, entre autres dans leurs fèces et, sporadiquement, pour certains, dans le lait (Sanaa 1993, 1994 ; Ménard et Sanaa 1994), alors que les animaux sensibles présenteront des formes cliniques.
- Que sait-on des fluctuations saisonnières de l'incidence des listérioses animales ?
- 292 Dans les pays de l'hémisphère Nord, de nombreux auteurs ont montré une augmentation du portage et/ou des cas en hiver et au printemps (d'octobre à juin, suivant les pays), époques où les animaux, suivant les techniques d'élevage, sont nourris avec de l'ensilage le plus souvent (Gray 1960b ; Nicolas *et al.* 1972, 1974, 1988 ; Lecoanet 1973 ; Watkins et Sleath 1981 ; Wardrope et McLeod 1983 ; Low et Renton 1985 ; Husu 1990 ; Gitter *et al.* 1986 ; Wilesmith et Gitter 1986 ; Bind et Delaval 1993, 1994 ; Donald *et al.* 1995 ; Fenlon *et al.* 1996 ; Stahl *et al.* 1996 ; Erdogan *et al.* 1997 ; Chand et Sadana 1999).
- Que sait-on de l'incidence de la listériose animale dans les autres pays ?
- 293 La maladie sévit dans la plupart des pays industrialisés de l'hémisphère Nord où existent des élevages intensifs ou semi-intensifs. Les espèces les plus souvent atteintes sont les ovins puis les caprins et les bovins. L'élevage peut s'effectuer en alternance sur prairies naturelles à la belle saison, en bergeries, en stabulations ou en étables l'hiver : c'est pendant cette dernière période que les cas semblent les plus fréquents. (cf. paragraphes 291 et 292). La maladie se présente aussi, sous forme de cas sporadiques dans les troupeaux. Si un ensilage est à l'origine des problèmes, l'affection peut devenir endémique dans une exploitation avec une importante mortalité. Le portage existe dans la plupart des troupeaux, à un taux variant entre 0,5 à 10 % des animaux, suivant les saisons.
- 294 Le **Tableau XXI** présente un inventaire des cas décrits dans le monde.
- Quelle est l'évolution de l'incidence de la listériose animale au cours des dernières années ?
- 295 Lors de l'enquête effectuée en mai-juin 1999 auprès des laboratoires d'analyses vétérinaires départementaux la majorité d'entre eux a répondu que les cas de listériose semblaient stables depuis plusieurs années, ou en diminution pour des types d'élevage (bovins, ovins) dont les produits de transformation sont sous certains labels ou certaines Appellations d'Origine Contrôlée (AOC) où les cahiers des charges sont stricts (contrôles importants, ensilages non utilisés, etc.).
- 296 Le nombre de cas par rapport à l'importance du cheptel montre une incidence de 13 cas-foyers par million de têtes de bovins (20 041 000 têtes de bovins en 1997 – BIMA 1999 – Source Agreste) sur une période d'un an et demi soit 8,7 cas-foyers par million de têtes de bovins et par an. Pour les ovins, les cas répertoriés montrent une incidence de 11 cas-foyers par million de têtes d'ovins (9 823 000 têtes d'ovins en 1997 – BIMA 1999 – Source Agreste) pour une période d'un an et demi soit 7,4 cas-foyers par million de têtes d'ovins et par an. Il est à noter que ces espèces font l'objet d'une surveillance sanitaire attentive, afin de préciser l'origine des signes nerveux dans le cadre de la prophylaxie des Encéphalopathies Spongiformes Subaiguës Transmissibles (ESST).

Tableau XXI Inventaire des cas décrits de listérioses animales décrits dans le monde

Pays	Référence(s)
Afrique : Kenya, Soudan	Arimi <i>et al.</i> 1997 ; Zakia <i>et al.</i> 1993
Allemagne	Weis et Seeliger 1975 ; Weber <i>et al.</i> 1993, 1995a, b ; Danielsson-Tham <i>et al.</i> 1997
Angleterre	Watkins et Sleath 1981 ; Wardrope <i>et al.</i> 1983 ; Fenlon 1985, 1986, 1996 ; Low et Renton 1985 ; Gitter <i>et al.</i> 1986 ; Low <i>et al.</i> 1993 ; McGowan <i>et al.</i> 1994, McLauchlin et Low 1994 ; Donald <i>et al.</i> 1995 ; Erdogan <i>et al.</i> 1997 ; Low et Donarchie 1997
Brésil	Peixoto 1995.
Canada	Woo-Sam 1999
Chine	Qu <i>et al.</i> 1996 ; Yang <i>et al.</i> 1994a, 1994b ; Wang <i>et al.</i> 1997, Liu <i>et al.</i> 1995
Corée	Kang <i>et al.</i> 1991
Danemark	Wegener <i>et al.</i> 1993 ; Jensen <i>et al.</i> 1996
Egypte	Abd-el-Ghaffar et Abd-Elgwad 1997
Espagne	Gaya <i>et al.</i> 1996 ; Vazquez-Boland <i>et al.</i> 1996
Etats-Unis	Olson <i>et al.</i> 1953 ; Olson et Segreen 1956 ; Gray 1960a, b ; Gray et Killinger 1966 ; Blenden <i>et al.</i> 1968 ; Welshimer 1968 ; Wallace et Hathcock 1995 ; Johnson <i>et al.</i> 1996 ; Wiedmann <i>et al.</i> 1996
Finlande	Husu 1990
Grèce	Giannati-Stefanou <i>et al.</i> 1997 ; Fthenakis <i>et al.</i> 1998
Hollande	Donker-Voët 1965
Inde	Dash <i>et al.</i> 1998 ; Chand et Sadana 1999
Irak	Al-Azawi 1999
Israël	Vishinsky <i>et al.</i> 1995
Italie	Bonardi <i>et al.</i> 1997
Japon	Inoue <i>et al.</i> 1992 ; Kato <i>et al.</i> 1994, Iida <i>et al.</i> 1998
Norvège	Gronstol 1979, 1980 ; Waldeland <i>et al.</i> 1993 ; Bjorland et Gronstol 1995
Nouvelle-Zélande	Johnstone 1990 ; Hudson et Mott 1994, Staples 1997
Pologne	Stanczak et Szczawinski 1996
Russie	Slivko 1965
Suède	Loncarevic <i>et al.</i> 1994b, 1995
Suisse	Hirsbrunner <i>et al.</i> 1997
Turquie	Ayaz <i>et al.</i> 1995

Question n°42 : Existe-t-il des portages animaux ?

- 297 De nombreux travaux ont été faits dans plusieurs pays. Presque toutes les espèces animales peuvent être porteuses de *Listeria*, y compris les arthropodes (arachnides, insectes, etc.) (cf. section E, **Tableau IX**, **Tableau X** et annexe 1).
- 298 Les portages intestinaux et mammaires ont fait l'objet de recherches et de travaux aussi bien en France qu'à l'étranger. (Nicolas *et al.* 1972, 1974, 1988 ; Bind et Delaval, 1993 ; Sanaa 1993 ; Sanaa 1994 ; Menard et Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996). L'excrétion de *L. monocytogenes* se retrouve suivant les saisons dans les excréments de nombreuses espèces animales y compris des oiseaux. (Fenlon 1985 ; Bouttefroy *et al.* 1997). Des travaux ont été faits sur de nombreuses espèces : bovins, ovins, caprins, porcins, équins, carnivores domestiques ou sauvages, rongeurs, reptiles, oiseaux domestiques et sauvages. Suivant l'alimentation des animaux, les techniques d'élevage, la saison, l'état physiologique des animaux, les pourcentages et la variabilité du portage de *L. monocytogenes* et/ou d'autres *Listeria spp.* peuvent être très différents d'un effectif à l'autre et au sein même d'un effectif ou de colonies d'animaux.
- 299 Des taux de 0,5 % à plus de 20 % d'individus porteurs au sein d'un même groupe ne sont pas rares. Les taux semblent plus élevés pour les bovins et les ovins en début de période hivernale quand les animaux sont en stabulation à l'étable ou en bergerie, que l'été à l'extérieur (Donker-Voët 1965 ; Slivko 1965 ; Nicolas *et al.* 1972, 1974, 1988 ; Husu 1990 ; Bind et Delaval 1993). Les taux de portage peuvent brutalement chuter avec des changements d'alimentation comportant des teneurs faibles voire inexistantes en *L. monocytogenes* (Sanaa *et al.* 1993 ; Sanaa 1994 ; Stahl *et al.* 1996). Le portage et l'excrétion mammaire de *L. monocytogenes* sont bien connus et les résultats des investigations sont d'une grande variabilité et quelquefois déroutants. Le portage peut aller de 0,01 % jusqu'à 5 voire 18 à 20 % lors de contrôles successifs et systématiques sur des laits de vaches, de brebis ou de chèvres apparemment saines. (Gaya *et al.* 1996 ; Rodriguez *et al.* 1994 ; Sanaa 1994 ; Jensen *et al.* 1996). Un animal peut excréter, au milieu d'un troupeau important, parfaitement sain et ce, pendant une période plus ou moins longue. Chez les autres espèces, porcins, équins, carnivores, reptiles, le portage est connu, mais semble plus mineur, de 0,01 % à 2 - 3 % suivant les expositions. Les rongeurs et les oiseaux domestiques ou

sauvages semblent des porteurs asymptomatiques le plus souvent, mais importants (de 2 à 50 % et même plus) (Goret et Joubert 1976 ; Fenlon 1985 ; Bind et Delaval 1993 ; Weber *et al.* 1993, 1994 ; Kato *et al.* 1994 ; Bouttefroy *et al.* 1997).

SECTION I : RÈGLEMENTS ACTUELS (AU 1/07/00) ET CLASSEMENT DES ALIMENTS

Question n°43 : Sur quelles bases peut-on estimer la densité maximale admissible d'un point de vue sanitaire ?

- 300 Les données concernant la relation dose-réponse sont parcellaires (cf. Section G). La notion actuelle de seuil admissible découle des dénombrements recueillis lors des épisodes épidémiques. La présence de *L. monocytogenes* dans de nombreux environnements fait que des quantités faibles de cette bactérie sont ingérées quotidiennement. Il est donc vraisemblable, encore que ceci ne puisse pas être démontré, que de faibles quantités ingérées ne sont habituellement pas dangereuses. Lors des épidémies, les concentrations en *L. monocytogenes* ne sont pas toujours déterminées avec des techniques comparables et peuvent concerner l'aliment avant sa commercialisation ou l'aliment en cours de consommation. Comme parallèlement les conditions de conservation avant prélèvement peuvent être critiques pour l'interprétation, la valeur de ces données est faible.
- 301 Comme les aliments mis en cause en cas d'épidémie étaient, dans un nombre important de cas, contaminés entre 100 à 1000 *L. monocytogenes/g*, de nombreux pays, dont la France, ont considéré qu'un aliment devenait potentiellement dangereux quand la concentration bactérienne dépassait 100 *L. monocytogenes/g*. Cependant, on ne peut exclure que, pour certaines populations à risque et dans certaines conditions, des contaminations plus faibles puissent déclencher une listériose. Le long délai d'incubation de la maladie fait que les quantités retrouvées ne sont pas celles qui ont causé la maladie ; ceci tend à accroître la valeur seuil du fait de la conservation et de l'aptitude de croissance à basse température de *L. monocytogenes*. Le concept de « concentration seuil » fait référence à une consommation stéréotypée des produits en quantité (portion) et en répétition de l'exposition (nombre de portions prises).
- 302 Si on tient compte de l'incertitude sur le nombre de bactéries réellement ingérées, de la surestimation des concentrations observées sur les aliments conservés par rapport à l'aliment ingéré, de l'écart important des inoculums pour toutes les épidémies, ce nombre de 100 *L. monocytogenes/g* paraît une valeur acceptable pour protéger une large part de la population à risque. Les techniques de dénombrement sont par ailleurs techniquement et statistiquement satisfaisantes pour estimer des populations bactériennes au-delà de 100 bactéries/g.
- 303 La densité critique du point de vue sanitaire de **100 *L. monocytogenes/g* à la consommation** a été proposé par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (CSHPF), en 1992, car les données épidémiologiques existantes montraient qu'aucune épidémie n'avait pour origine un aliment présentant moins de 100 *L. monocytogenes/g*, au moment de la consommation. Il n'existe pas actuellement de données suffisantes conduisant à proposer sa modification.

Question n°44 : Quelle est la position actuelle des règlements nationaux et internationaux ?

- 304 Au plan national et quelles que soient les denrées alimentaires, la note de service DGAL/SDHA/N98/N° 8088, du 12 mai 1998 édicte les instructions aux services de contrôle dans le cadre de la gestion des non conformités. Cette dernière, dans son annexe 4, indique clairement que, « compte tenu de la gravité de la listériose humaine, le critère cible, tant à la production qu'à la distribution, reste bien l'absence de *L. monocytogenes* dans 25 grammes de produits ». Toutefois, ce texte admet une tolérance pour certaines productions, pour lesquelles ce critère, malgré l'application de bonnes pratiques hygiéniques, apparaît difficile à atteindre ; celle-ci n'est acceptable que dans le cas où les études de vieillissement réalisées sur ces produits démontrent qu'à la date limite de consommation, le nombre de *L. monocytogenes* demeure inférieur à 100 unités formant colonies par gramme. Ce seuil a été proposé en 1992 par le CSHPF. Le classement actuel de ces produits (**Tableau XXII**), fondé sur les technologies de production, admet cette tolérance pour les « aliments n'ayant pas fait l'objet de traitement assainissant ou susceptibles d'avoir été re-contaminés après traitement » ; ceci concerne principalement les produits crus tels les produits végétaux de 4^{ème} gamme et certains laits et produits laitiers, les produits fumés et/ou séchés, ainsi que les produits ayant été re-manipulés avant leur conditionnement.

Tableau XXII Classement des aliments et seuils critiques de l'annexe 4 de la note de service DGAI/SDHA/N98/N°8088

	Recherche de <i>L. monocytogenes</i> dans 25 g (sur 5 unités)	Dénombrement (sur 5 unités)	Critères applicables à la PRODUCTION	Critères applicables à la DISTRIBUTION
Catégorie A : Aliments spécialement destinés à la consommation par des populations à risque (aliments pour nourrissons, aliments spéciaux à usage médical)	Oui	Inutile	Absence dans 25g	Absence dans 25g
Catégorie B : Aliments ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés aseptiquement après traitement	Oui	Inutile	Absence dans 25g	Absence dans 25g
Catégorie C1 : Produits crus ou ayant subi un traitement insuffisant pour les assainir, à l'exception des produits à base de lait, qu'ils soient consommés crus ou après cuisson	Oui	Oui	Absence dans 25g ; tolérance possible si les tests ont montré que le critère à la distribution était respecté	m=100/g, avec n=5 et c=0 : tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat « non satisfaisant » pour l'échantillon ⁽¹⁾
Catégorie C2 : Produits ayant subi un traitement assainissant puis manipulés avant conditionnement, à l'exception des produits à base de lait	Oui	Oui	Absence dans 25g ; tolérance possible si les tests ont montré que le critère à la distribution était respecté	m=100/g, avec n=5 et c=0 : tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat « non satisfaisant » pour l'échantillon ⁽¹⁾
Catégorie C3 : Produits à base de lait autres que ceux visés aux point A et B	Oui	Utile	Absence dans 25g ou dans 1g pour certains fromages (Arrêté du 30 mars 1994)	m=100/g, avec n=5 et c=0 : tout résultat sur une unité supérieur à 100 <i>L. monocytogenes</i> /g conduit à conclure à un résultat « non satisfaisant » pour l'échantillon ⁽¹⁾

(1) La limite de 100 *L. monocytogenes* par gramme correspond à une tolérance qui n'est acceptable que dans le cas où le producteur de la denrée a fait réaliser une « étude de vieillissement » prouvant qu'à la DLC la denrée respecte le critère fixé dans la colonne distribution

- 305 Enfin, la Commission a constaté dans le cadre de ses travaux qu'il n'apparaissait pas de raison objective de distinguer les produits de charcuterie de la catégorie C2 des produits de la catégorie C3. Elle a recommandé que les critères microbiologiques au regard de *L. monocytogenes* applicables en fin de production aux produits de la catégorie C3 soient étendus aux produits de charcuterie de la catégorie C2. Ceci s'est traduit par un Avis de l'AFSSA (Avis AFSSA du 14 janvier 2000) recommandant, que « la réglementation concernant les critères microbiologiques au regard de *L. monocytogenes* applicables aux produits de charcuterie traités thermiquement puis manipulés avant conditionnement sur le lieu de production et conservés à l'état réfrigéré, (...) soit renforcée, en soumettant ces produits aux mêmes critères que ceux applicables aux produits à base de lait autres que ceux ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés aseptiquement après traitement (absence de *L. monocytogenes* dans 25g en fin de production, sans tolérance) ». Suite à cet avis, des instructions dans ce sens ont été adressées par la DGAI aux services de contrôle concernés.
- 306 Aucune réglementation communautaire ne couvre l'ensemble des productions. Toutefois la Directive Européenne 92/46/CEE fixe des critères microbiologiques pour les produits laitiers et mentionne l'absence de *L. monocytogenes* dans 1 ou 25 grammes. Selon Gravani (1999), des recommandations ou des critères relatifs aux denrées alimentaires, ont été établis dans de nombreux pays ; certains comme les Etats Unis et l'Italie préconisent l'absence totale dans 25 grammes de produits ; d'autres, notamment en Europe (Allemagne, Pays-Bas, France) tolèrent la présence de 100 ou même 1 000 *L. monocytogenes* dans un gramme de certaines denrées au moment de leur consommation ; d'autres, enfin, comme le Canada et le Danemark, appliquent ce critère d'une contamination inférieure à 100 *L. monocytogenes* par gramme pour certain produits, et d'absence de ces microorganismes dans d'autres, et en particulier pour ceux qui présentent des facteurs écologiques favorisant la croissance bactérienne et dont la durée de conservation est relativement longue. Plus récemment un rapport du Comité Scientifique Vétérinaire de Santé Publique (Anonymous 1999b), a proposé des recommandations fondées elles aussi sur des tolérances admises en fonction de la technologie employée (**Tableau XXIII**) ; ce tableau a été établi à partir d'éléments recueillis dans différents Etats Membres (Allemagne, Danemark).

Tableau XXIII Classement des produits prêts à être consommés et critères proposés (EC - 29/09/99)

Aliments	Critères proposés
A : Aliments traités dans le conditionnement	
B : Produits ayant subi un traitement thermique, puis manipulés, et supportant la croissance de <i>L. monocytogenes</i> au cours de la conservation à la température préconisée.	Absence de <i>L.monocytogenes</i> dans 25 g de produits à la production
C : Produits ayant subi un léger traitement, non thermiquement, et supportant la croissance de <i>L. monocytogenes</i> au cours de la conservation à la température préconisée.	
D : Produits ayant subi un traitement thermique, puis manipulés, et stabilisés contre la croissance de <i>L. monocytogenes</i> au cours de la conservation à la température préconisée	m<100 <i>L.monocytogenes</i> /g au moment de la consommation, et pendant toute la conservation.
E : Produits légèrement traités, non thermiquement, et stabilisés contre la croissance de <i>L. monocytogenes</i> au cours de la conservation à la température préconisée.	
F : Produits crus, prêts à être consommés.	

Tableau XXIV Exemples de produits (EC - 29/09/99)

Catégorie	Exemples de produits
B - D	Produits carnés tels le jambon cuit, les saucisses, les poissons fumés à chaud, les fromages à pâte molle fabriqués à partir de lait pasteurisé.
C - E	Poissons ou produits carnés fumés à froid, fromages fabriqués à partir de laits non pasteurisés
F	« Tartare », légumes tranchés, graines germées

La séparation respective entre les groupes B et D, et C et E, est fondée sur la technologie de préparation utilisée.

307 Nous pouvons également noter qu'au Canada, une classification des aliments a été proposée, en se basant, non pas sur les paramètres technologiques appliqués aux produits, mais plutôt sur les risques avérés et la microbiologie prévisionnelle (Farber *et al.* 1996) ; ceci se traduit par un classement en :

- aliments ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes* ;
- aliments permettant le développement de *L. monocytogenes*, et ayant une durée de conservation supérieure à 10 jours ;
- aliments permettant le développement de *L. monocytogenes*, et ayant une durée de conservation inférieure à 10 jours ;
- aliments ayant été reliés à des épidémies de listérioses.

• Quelles orientations peuvent être prises pour une classification adaptée des aliments ?

308 D'une manière générale, toutes ces classifications des aliments reposent sur leur aptitude à permettre la croissance, sur les phases technologiques de recontaminations éventuelles, et sur les durées de conservation. Le seuil de 100 *L. monocytogenes*/g ou /ml est souvent noté comme la limite supérieure acceptable. Il peut sans doute exister des sujets sensibles à l'ingestion de produits plus faiblement contaminés, mais aucune information n'est véritablement disponible sur ce point.

309 Ainsi, sur la base des points précédemment évoqués, et, eu égard au risque que représente la présence de *L. monocytogenes* dans les aliments, les classifications de ceux-ci, telles que proposées par le « Scientific Committee of Veterinary Measures relating to Public Health » (**Tableau XXIII** et **Tableau XXIV**), ou par le Canada, peuvent être considérées comme une base satisfaisante de réflexion, à condition de bien préciser, à l'aide d'exemples, les catégories auxquelles ils se rattachent.

Question n°45 : Comment déterminer des durées de conservation des produits ?

310 La Date Limite de Consommation (DLC) est une date **impérative** mentionnée sur le conditionnement des denrées périssables ; elle indique clairement le moment jusqu'auquel ce produit conserve ses propriétés spécifiques dans les conditions appropriées. Au-delà de cette date, les produits sont considérés comme impropres à la consommation, doivent être retirés de la vente et ne doivent pas être consommés. Dans la majorité des cas, cette date limite de consommation est déterminée par le fabricant, et est différente de la Date Limite d'Utilisation Optimale (DLUO) ; cette dernière est une **indication**, informant l'acheteur de la durée pendant laquelle une denrée conserve toutes ses qualités organoleptiques, mais celle-ci pourra être commercialisée et consommée après le dépassement de cette date ; elle est également déterminée par le fabricant en fonction de critères purement organoleptiques.

- 311 La date limite de consommation concerne donc principalement les produits non stabilisés, dans lesquels les bactéries psychrotrophes continuent leur croissance jusqu'à un seuil au-delà duquel le produit est considéré comme altéré, et donc impropre à la consommation, du fait de l'apparition d'odeurs désagréables ou de couleurs anormales. Cette durée de vie est variable, pour un même type de produits réfrigérés, en fonction non seulement du mode de conditionnement (film perméable aux gaz, sous-vide, sous atmosphères modifiées) mais également du niveau de contamination initiale. Il appartient donc au fabricant de valider, par un test de vieillissement adapté, tenant compte de ces paramètres, la durée de vie de son produit. Au plan national, une norme expérimentale, élaborée par l'AFNOR, précise les modalités d'application de ce test en y intégrant des simulations de ruptures de la chaîne du froid, mais ne règle pas les problèmes sanitaires spécifiques.
- 312 En effet, il convient de rajouter que *L. monocytogenes* est également une bactérie psychrotrophe qui peut poursuivre son développement lors de la conservation. De plus, d'autres paramètres, tels que l'état physiologique en fin de conditionnement, la température, le délai avant consommation et le type d'aliment sont des facteurs plus ou moins favorables à la croissance de cette bactérie pouvant poursuivre son développement lors de la conservation et de l'usage du produit par le consommateur. En conséquence, il paraît nécessaire de réaliser, pour ces produits, un test de conservation ou d'employer la microbiologie prévisionnelle et de prévoir une date limite que l'on pourrait qualifier de « sanitaire ».
- 313 Ce test de conservation doit, pour être crédible, être réaliste tant par le nombre de *L. monocytogenes* initial que par le scénario de vie du produit. Les phases de stockage, de transport, de vente, puis de transport et de conservation par les particuliers, ainsi que le mode de consommation, doivent être connus et pris en compte. Goulet *et al.* (1997) ont ainsi montré que les ruptures de la chaîne du froid chez le consommateur, liées à des sorties répétées du produit pour consommation, augmentaient le risque de listériose. D'après les données des plans de surveillance de 1993 à 1996 de la DGCCRF, la fréquence à la vente des charcuteries cuites contenant plus de 100 *L. monocytogenes*/g était de 1,1 % et de 0,6 % contenant plus de 1000/g (cf. **Tableau XIII**). Si l'on exclut la recontamination dans la chaîne transport-distribution, ce qui correspondrait par exemple, à des emballages non protecteurs, l'hypothèse restante et la plus vraisemblable est que les aliments sortent de production avec une présence de *L. monocytogenes* en nombre inférieur à 100/g mais les DLC trop longues ou les conditions de refroidissement non respectées conduisent à dépasser le seuil critique de 100 *L. monocytogenes*/g et même ponctuellement de 1000 *L. monocytogenes* /g pour certains.
- 314 Pour les produits permettant la croissance de *L. monocytogenes*, une bonne connaissance de la contamination initiale est impérative pour garantir que la DLC soit réaliste et reproductible. Dans ce cas l'inoculum initial doit être connu avec sécurité. La règle de recherche de *L. monocytogenes* dans 25 g semble appropriée car elle est obtenue par une méthode qui est globalement fiable et elle permet de fixer un inoculum maximal à la production dont la détermination correspond à des normes précises et internationales. L'inoculum est ainsi stable et permet des projections dans le temps, dont les résultats pourront être considérés comme reproductibles. Elle garantit, dans une certaine mesure, la sécurité si les conditions de stockage s'écartent des conditions prévues. Par contre, il est inutile pour certains produits, ne permettant pas le développement de *L. monocytogenes* durant la conservation, de fixer une « tolérance zéro » à la production. Dans ces cas un test d'épreuve ou une simulation (microbiologie prévisionnelle) réaliste permettra de fixer la DLC ; cependant, même pour ces produits, le seuil critique (100 *L. monocytogenes*/g) ne doit pas être dépassé à la consommation. Enfin, compte tenu des observations précédentes, il paraît utile d'intégrer à cette analyse sur les durées de vie des produits réfrigérés susceptibles de permettre la croissance de *L. monocytogenes*, les conditions d'emploi de ces denrées, notamment après l'ouverture du conditionnement.
- 315 Des exemples de l'emploi des simulations numériques (microbiologie prévisionnelle) sont donnés dans l'annexe 2.

SECTION J : MICROBIOLOGIE PRÉVISIONNELLE

Question n°46 : Quels sont les principes généraux de la microbiologie prévisionnelle ?

- 316 L'évaluation du devenir d'une contamination microbienne comme *L. monocytogenes*, dans un produit alimentaire, repose sur une connaissance précise des flores et des effets des conditions environnementales (produits, température, etc.). Cette connaissance s'appuie aujourd'hui sur des procédures expérimentales qui, étant donné les délais et les coûts, ne peuvent pas prendre en compte toutes les situations (modifications du procédé de fabrication, incidence de différentes ruptures de chaîne du froid, par exemple). Pour cette raison, en complément de l'expérience, sont de plus en plus utilisées des approches par simulation décrivant le comportement des flores microbiennes dans les produits dans ces diverses conditions.
- 317 Pour simuler la cinétique de croissance ou de décroissance d'une population bactérienne en tenant compte des contraintes environnementales, le modèle dynamique sous contrainte (encore appelé « modèle global ») décrivant les variations de la concentration bactérienne doit être de la forme : $c = f[t; h(\text{histo}, g(T, pH, a_w, \dots))] + \varepsilon$ où f , h et g sont des modèles numériques, T , pH , a_w , etc. sont les variables environnementales. Cette forme générale se décompose donc en modèle dynamique reliant la concentration bactérienne c au temps t ($c = f(t; \theta) + \varepsilon$) où θ est le vecteur des paramètres, en modèle des contraintes sur la dynamique, reliant les paramètres θ du modèle dynamique aux variables environnementales ($\theta = g(T; pH, \text{etc}) + \varepsilon$) et en modèle d'états ($\theta = h[\text{historique}] + \varepsilon$) qui relie les paramètres de la dynamique à l'historique de la culture (stress etc.). Dans ces modèles, ε correspond à une incertitude inhérente aux techniques de mesure.
- 318 Classiquement, le modèle dynamique est ajusté sur des jeux de données, obtenues par des dénombrements effectués à différents instants t , les paramètres θ de ce modèle sont estimés (par exemple, le taux de croissance maximum, μ_{max}), puis dans un second temps, le modèle des contraintes ajusté à son tour sur des données exprimant en fonction des variables environnementales. En fait, le modèle dynamique sous contrainte peut être directement ajusté sur l'ensemble des données, améliorant généralement l'estimation des paramètres (Bréand *et al.* 1998).
- 319 Il apparaît donc, d'après ce qui précède, que la microbiologie prévisionnelle fait appel à la fois à des connaissances sur la physiologie des cellules microbiennes dans l'environnement auquel elles sont soumises et à une approche de simulation numérique qui sous entend la prise en compte de critères et une pratique en accord avec les contraintes liée à cette technique. Les effets des facteurs environnementaux spécifiques au produit, sont déterminés habituellement à partir d'une croissance expérimentale. De ce fait il sera plus juste de parler, d'utilisation à visée prévisionnelle d'une microbiologie quantitative par simulation numérique.

Question n°47 : Quels modèles de croissance sont actuellement utilisés pour *L. monocytogenes* ?

- 320 Les modèles dynamiques candidats sont nombreux, mais la tendance est de privilégier les modèles dont les paramètres ont une signification biologique simple, compréhensible par le biologiste. En effet, pour décrire les phases de croissance des populations microbiennes (latence, croissance et saturation), les microbiologistes utilisent classiquement des paramètres comme le taux de croissance maximum μ_{max} , le temps de latence lag , l'inoculum x_0 et la densité maximale x_{max} .
- 321 Deux groupes de modèles sont aujourd'hui proposés pour l'ensemble des micro-organismes y compris *L. monocytogenes* : *i*) des modèles visant à reproduire la forme sigmoïde des courbes observées (en représentation semi-logarithmique) comme le modèle reparamétré de Gompertz ; *ii*) des modèles obtenus à partir d'une construction dynamique (formulation différentielle) associant variation initiale du taux de croissance, progression exponentielle et saturation à partir d'hypothèses dynamiques (exemple : les modèles de Baranyi ou de Rosso).
- 322 Seuls les modèles du second groupe sont construits à partir des paramètres classiques, énoncés ci-dessus. De plus, après analyse statistique, il apparaît que la forme simple, définie uniquement à partir des quatre paramètres classiquement utilisés par les microbiologistes, est la plus appropriée à la qualité des données obtenues par dénombrement (Baranyi et Roberts 1994 ; Rosso *et al.* 1996) :

$$\begin{aligned}
 t < lag, \quad \frac{dx}{xdt} &= 0 \\
 t \geq lag, \quad \frac{dx}{xdt} &= \mu_{\max} f(x) \\
 f(x) &= 1 - \frac{x}{x_{\max}}
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Une solution, obtenue pour une valeur fixe des paramètres (conditions environnementales constantes) et pour $x(0)=x_0$, est la suivante :

$$\begin{aligned}
 t < lag, \quad x(t) &= x_0 \\
 t \geq lag, \quad x(t) &= \frac{x_{\max}}{1 + \frac{x_{\max}}{x_0} - 1 e^{-\mu_{\max}(t-lag)}}
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

323 La Figure 3 et la Figure 4 présentent des exemples d'ajustement de ce modèle dynamique simple sur des jeux de données avec *L. monocytogenes* dans des produits alimentaires.

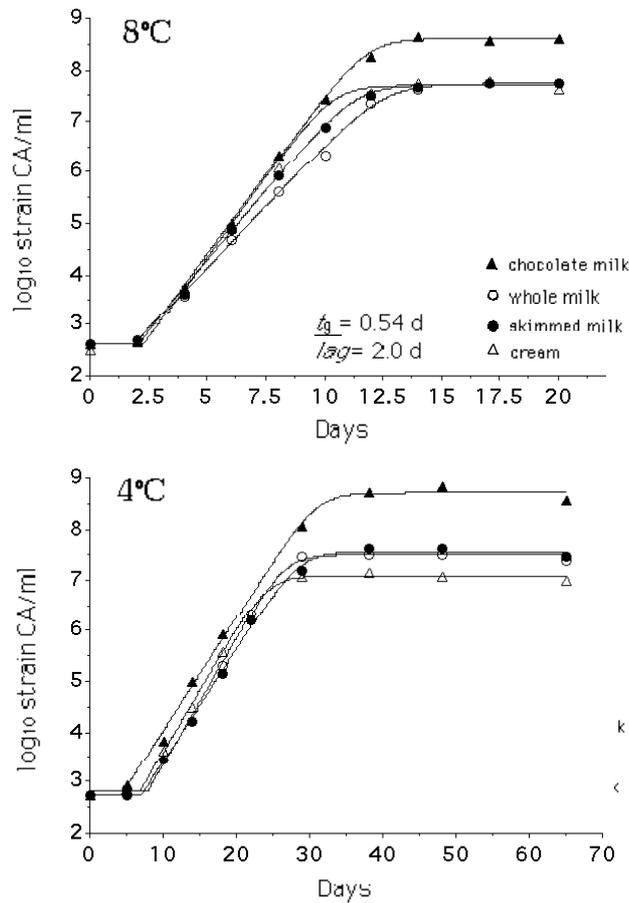


Figure 3 Ajustement du modèle dynamique [1] sur des données de *L. monocytogenes* dans des produits laitiers (d'après Rosso *et al.* 1996). Les valeurs moyennes des estimations du temps de latence *lag* et du temps de génération ($tg = \ln 2 / \mu_{\max}$), aux 2 températures sont portées sur le graphique.

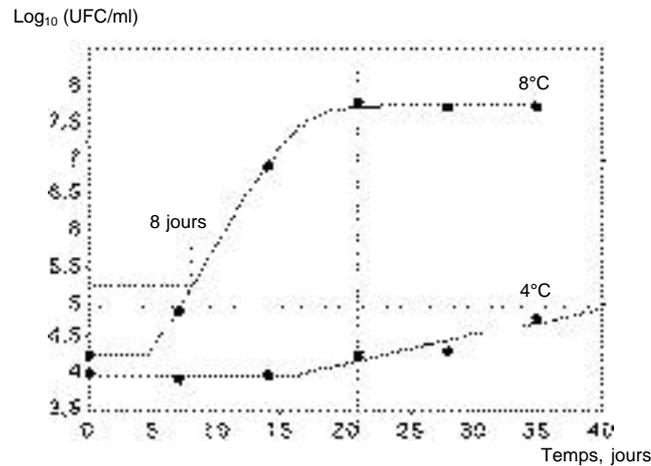


Figure 4 Ajustement du modèle dynamique [1] sur des données de *L. monocytogenes* dans du saumon fumé (d'après Rosso *et al.* 1996).

324 Il est donc important de rappeler que si l'ajustement de ce modèle dynamique permet d'estimer des valeurs de paramètres conformes à celles qui sont obtenues par les microbiologistes par d'autres techniques d'estimations (régression linéaire sur la portion exponentielle, dilutions en série, etc.), il n'en est pas de même avec les modèles du premier groupe largement utilisés aujourd'hui. Ainsi le modèle de Gompertz, utilisé notamment dans le « Pathogen Modelling Program » de l'USDA, est construit pour des valeurs de taux de croissance qui ne sont pas comparables à celles qui sont mesurées habituellement. Ces valeurs sont très spécifiques du modèle utilisé.

Question n°48 : Comment modéliser la relation croissance de *L. monocytogenes* - température ?

325 Les travaux de Junttila *et al.* (1988) avaient pour objectif de déterminer la température minimale de croissance sur Trypticase Soy Agar de 78 souches animales de divers sérovars de *L. monocytogenes* pour des temps d'incubation n'excédant pas 10 jours. Les températures minimales sont distribuées entre 0,5°C et 2,5°C avec une moyenne égale à $1,1 \pm 27,3$ % (moyenne \pm coefficient de variation en %). Junttila a pu mettre en évidence la croissance de 27 souches sur 78 à des températures inférieures à 1°C tout en précisant que la croissance de *L. monocytogenes* est parfaitement possible à de plus faibles températures, mais pour des temps d'incubation supérieurs à 10 jours. Walker *et al.* (1990), sur trois souches, par une autre méthode et pour un temps d'incubation supérieur à 50 jours trouvent -0,1 ; -0,4 et -0,2°C.

• Modélisation de l'effet de la température.

326 Classiquement μ_{\max} est étudié en fonction de la température à partir d'une représentation de la forme racine carrée, ceci en raison d'une fluctuation de la variance des valeurs en fonction de la température qui est stabilisée sous cette représentation (voir **Figure 5**). Pour la majorité des bactéries étudiées jusqu'alors, la relation entre $\sqrt{\mu_{\max}}$ et la température peut être décrite à partir de modèles simples comme le modèle de Ratkowsky *et al.* (1983), le modèle de Zwietering *et al.* (1991), ou le modèle à valeurs cardinales (Rosso *et al.* 1993). Ce dernier, contrairement aux autres, est le seul dont les 4 paramètres ont une signification commune pour les microbiologistes (T_{\min} , T_{opt} , T_{\max} et μ_{opt} , le taux de croissance maximum à T_{opt}) et il est aujourd'hui retenu par de nombreux auteurs pour ces qualités à la fois pratiques et théoriques. Ces différents modèles sont cependant très proches aux températures sub-optimales (entre T_{\min} et T_{opt}), car ils décrivent tous une évolution linéaire de $\sqrt{\mu_{\max}}$ dans ce domaine thermique.

327 Comme l'ont montré les auteurs, ces modèles, et notamment les modèles à valeurs cardinales, sont utilisables pour la plupart des germes microbiens (bactéries, levures et moisissures) donc en particulier pour *L. monocytogenes*. Cependant, il a aussi été montré que la tendance linéaire de $\sqrt{\mu_{\max}}$ observée généralement à des températures sub-optimales n'est pas retrouvée de manière systématique pour l'ensemble des souches de *L. monocytogenes*. Cette variation par rapport au modèle général, appelée « anomalie *L. monocytogenes* » a été mise en évidence sur la souche CIP 7831 et deux autres souches, et retrouvée lors de croissance dans le lait (Bajard *et al.* 1996). Cette anomalie doit être prise en compte dans les simulations pour des températures inférieures à 4°C, température à partir de laquelle les prévisions

effectuées avec le modèle général s'éloignent significativement des valeurs observées (Rosso 1995). Pour introduire cette anomalie, le modèle CSC (« Continuous Slope Change ») a été proposé (Bajard *et al.* 1996).

328 Le modèle à valeurs cardinales, utilisé dans les logiciels français de simulation des dynamiques de croissance des bactéries dans les aliments, ne tient pas compte de l'anomalie *L. monocytogenes*, mais permet quand même des prévisions à un niveau satisfaisant et tout à fait compatible avec son emploi, sa comparaison avec le modèle CSC (Bajard *et al.* 1996) montrait peu de différences sauf pour les températures très basses (moins de 2°C). Le modèle CSC introduit par ailleurs des paramètres supplémentaires et est plus difficile à prendre en compte.

- La température minimale de croissance.

329 Dans la littérature (Augustin 1999), la température minimale de croissance est estimée régulièrement en dessous de 0°C (6 publications sur 26). Augustin fonde son choix des températures cardinales sur la médiane des valeurs de la littérature et prends $T_{\min} = -2,7^{\circ}\text{C}$ sans tenir compte de « l'anomalie *Listeria* » évoquée ci-dessus, et sous-estime ainsi les aptitudes de croissance à basse température. La température minimale théorique obtenue avec le modèle CSC est de l'ordre de -5°C .

330 Les simulations utilisant une croissance à température légèrement négative (-1°C ou $-0,5^{\circ}\text{C}$) sont utilisées habituellement et ont été confrontées à des données de développement en milieux alimentaires avec succès. En dessous de $0,5$ ou 1°C , la croissance est très lente et peut être négligée.

- La température maximale de croissance.

331 Expérimentalement T_{\max} se situe au-delà de 42°C . La modélisation permet d'estimer cette température maximale de croissance, selon les auteurs à $42,3^{\circ}\text{C}$ (Bajard *et al.* 1996), $45,5^{\circ}\text{C}$ (Duh et Shaffner 1993) et même $47,7^{\circ}\text{C}$ (Petran et Zottola 1989).

332 Si l'on considère le cas de la souche CIP7831, pour laquelle une importante série de données a été publiée (**Figure 5**), il est peu vraisemblable que la température limite de croissance soit supérieure à 45°C . On peut sans grand risque la fixer à $42-43^{\circ}\text{C}$. Augustin (1999) fondant son choix des températures cardinales sur la médiane des valeurs de la littérature prend $T_{\max} = 45,5^{\circ}\text{C}$, cette valeur est satisfaisante au vu du manque de données dans la littérature et des difficultés de l'estimation du paramètre T_{\max} correspondant à cette carence d'information.

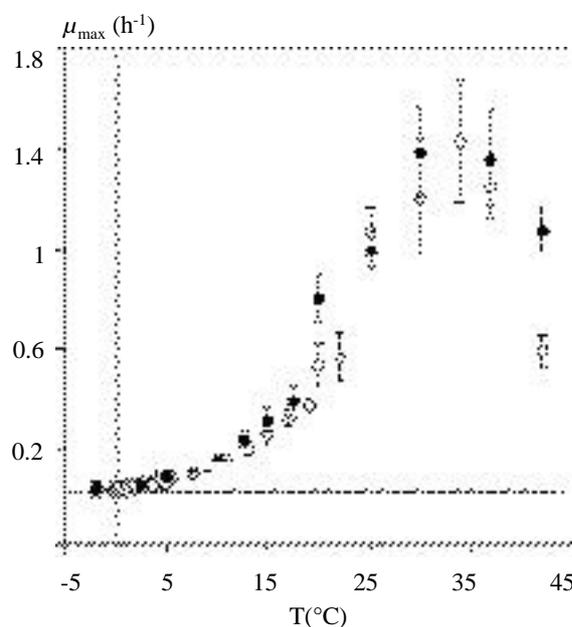


Figure 5 Taux de croissance spécifique maximum et intervalles de confiance individuels à 95 % correspondant pour *L. monocytogenes* CIP 7831 *L. monocytogenes* Scott A en fonction de la température (Bajard *et al.* 1996).

- La température optimale de croissance.

333 Elle est déterminée en ajustant un modèle mathématique de la relation entre μ_{\max} et la température. Très peu d'informations quantitatives sont retrouvées dans la littérature et leur interprétation dépend du modèle employé. La température optimale de croissance est située, dans la littérature, entre $38,7^{\circ}\text{C}$ et $39,7^{\circ}\text{C}$ mais

d'autres données, reflétant plus un « savoir faire » que de réelles expérimentations donnent T_{opt} situé entre 30 et 37°C. Une réévaluation des données de Bajard conduirait à reconnaître un T_{opt} voisin de 35°C.

Question n°49 : Comment modéliser la relation croissance de *L. monocytogenes*-pH ?

- 334 Ils ont été peu étudiés. Le pH_{min} obtenu dans un milieu de culture avec un acide fort est d'environ pH 4,4. Le pH_{max} 9,2 (Rosso *et al.* 1995).
- 335 Les travaux de Sorrells *et al.* (1989) et de George *et al.* (1988) avaient pour objectif de déterminer le pH minimum permettant la croissance de plusieurs souches de *L. monocytogenes* en fonction de la température. Quatre souches ayant été utilisées, les auteurs n'ont pas pu conclure à des différences intersouches significatives. Sorrells *et al.* (1989) prétendent cependant qu'une partie des différences de μ_{max} observées entre souches pourraient être dues à un effet souche.
- 336 Parmi les autres études dont l'objectif était de mesurer l'effet du pH sur la croissance d'une souche de *L. monocytogenes*, seuls deux jeux de données peuvent être comparés pour une température constante fixée à 30°C et deux jeux de données pour une température fixée à 5°C. La plupart des autres études se sont généralement contentées de plans expérimentaux où l'effet du pH n'est mesuré que pour deux valeurs distinctes de pH.
- 337 Augustin dans sa compilation étendue à des plans d'expérience plus complexes propose d'approximer les pH cardinaux par les médianes des données publiées et fixe pH_{min} à pH 4,55 ; pH_{opt} à pH 7,10 et pH_{max} à pH 9,61 (Augustin 1999).
- 338 Il est enfin important de rappeler que le pH_{min} est fortement dépendant de la nature et de la concentration de l'acide utilisé ainsi que du pouvoir tampon du produit. Un modèle décrivant l'évolution de ce pH_{min} , dans un milieu de culture en fonction du pKa de l'acide utilisé, a été proposé et validé pour des souches de *L. monocytogenes* (Rosso *et al.* 1997).

Question n°50 : Comment modéliser relation croissance de *L. monocytogenes*- a_w ?

- 339 L' a_w minimum est voisine de 0,9. Elle varie en fonction des moyens de l'obtenir (cf. Section A). Plusieurs modèles ont été construits en vue de prédire l'effet de l' a_w conjugué à celui d'autres paramètres (T° , pH, etc.) sur les paramètres de croissance d'une bactérie. Toutefois il n'existe aucun modèle mesurant exclusivement l'effet de ce facteur environnemental. Les travaux de Nolan *et al.* (1992) avaient pour but de déterminer l' a_w minimale permettant la croissance de *L. monocytogenes* et de *L. innocua*. Toutefois, le seul jeu de données exploitable (valeurs du taux de croissance à différentes valeurs d' a_w et à pH et T° constants) est issu des travaux de Petran et Zottola (1989). Aucune comparaison de données sur l'effet de l' a_w n'a donc pu être effectuée.

Question n°51 : Comment modéliser la relation croissance de *L. monocytogenes*- O_2/CO_2 atmosphère ?

- 340 Les connaissances sur la relation atmosphère - croissance sont actuellement absentes, or elles sont indispensables pour les simulations de croissance en atmosphère contrôlée.

Question n°52 : Comment modéliser la relation phase de latence - μ ?

- 341 En microbiologie prévisionnelle, le paradigme de la relation $\mu_{max} \times Lag = K$ est largement utilisé. Pour *L. monocytogenes* K varie en fonction de l'historique de la culture (changement de température, stress), de la souche, du milieu. La relation hyperbolique n'est pas certaine quand *L. monocytogenes* est placée dans des conditions voisines de ses limites physiologiques. La longueur de la phase de latence augmente lors de stress, par exemple thermique (Bréand *et al.* 1998 ; Augustin *et al.* 2000) et est d'autant plus grand que l'inoculum est faible en condition de stress bactérien (Gay *et al.* 1996 ; Augustin *et al.* 2000). Les plans d'expérience concernant les inoculums faibles sont cependant difficile à réaliser du fait de l'erreur d'échantillonnage

Question n°53 : Que sait-on des modèles de relation mortalité-température (et autres facteurs) ?

- 342 Pour toutes les températures supérieures à T_{max} , une certaine mortalité bactérienne apparaît. Classiquement la courbe de survie est représentée par le logarithme du nombre de survivants en fonction

du temps d'exposition à une température non permissive et dans la plupart des cas la relation est alors linéaire.

343 Cette relation linéaire entre le logarithme du nombre de survivants et le temps d'exposition a conduit à l'emploi d'indicateurs simples résumant la cinétique comme le taux de mortalité ou le temps de réduction décimale (« decimal reduction time » : D-value). En 1920, Bigelow (1920 ; Bigelow and Esty 1920b) a observé une relation linéaire entre le logarithme du taux de mortalité et la température de traitement. De cette observation est issu un indicateur très utilisé, Z, la « Z-value » étant l'inverse de la pente de la droite. Malheureusement les courbes de survie ne sont pas toutes linéaires sans que ceci puisse être expliqué d'un point de vue théorique. Ce phénomène est plus prononcé et fréquent pour des traitements thermiques doux dont l'emploi est de plus en plus fréquent en milieu industriel, dans ce cas la D-value (ou D10) et la z-value sont inutilisables.

344 Les courbes de survie de *L. monocytogenes* exposée à une hausse de température sont nettement biphasiques avec un plateau précédant la mortalité. Un modèle linéaire par parties (absence de mortalité pendant le plateau, mortalité à taux constant k après) s'avère satisfaisant. Il correspond à une transition instantanée entre plateau et mortalité. A partir de ses résultats, la variation de k en fonction de la température a été décrite par le modèle (Bréand *et al.* 1998) où z est la classique Z_{10} -value :

$$k = -a.10^{\frac{T_s - 53}{z}} \quad [3]$$

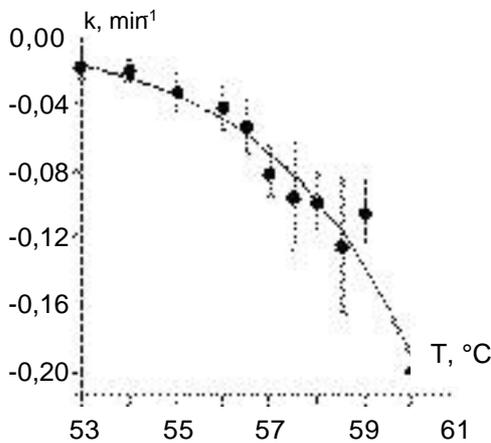


Figure 6 Relation entre le taux de mortalité et la température de stress. Les intervalles de confiance 95 % ont été calculés par eustachage (sauf à 60°C, 4 points seulement). Le modèle proposé est superposé aux données.

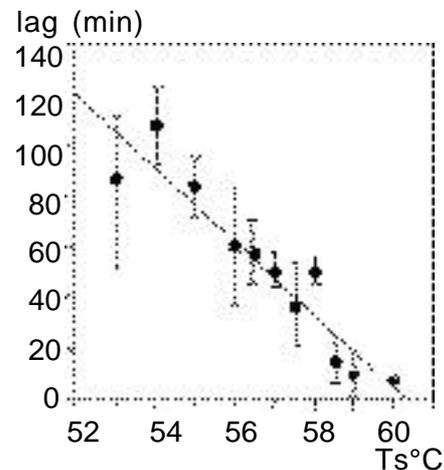


Figure 7 Relation entre la latence à la mortalité (lag) et la température de stress (Ts). Les intervalles de confiance 95 % ont été calculés par eustachage (sauf à 60°C, 4 points seulement). Le modèle proposé est superposé aux données.

345 Dans le cas de la latence à la mortalité est :

$$lag = c - d(T_s - 53) \quad [4]$$

avec T_s variant de 53° à 60°C.

346 La combinaison des trois modèles en un permet de représenter la variation de $\text{Log}_{10}(\text{UFC/ml})$, quand la durée de stress d_s et T_s varient.

347 Ce modèle complet des interactions a été ajusté sur l'ensemble des 120 points expérimentaux et ses paramètres ont été estimés avec plus de précision qu'avec la méthode itérative de construction précédente. En utilisant ce modèle, des ensembles de valeurs de (d_s , T_s) induisant la même mortalité, peuvent être calculées et représentées sur des graphes. Elles ne correspondent pas aux valeurs calculées par la loi de Bigelow.

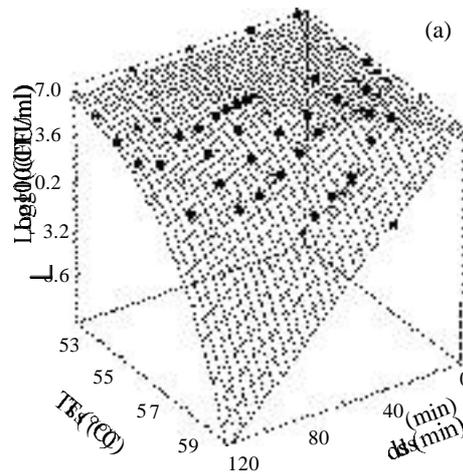


Figure 8 Evolution de $\text{Log}_{10}(\text{UFC/ml})$ quand d_s et T_s varient. La surface théorique correspond au modèle. Les points correspondant aux observations du côté « non sécurité » du modèle et les points pour lesquels la prédiction et l'observation sont égales (à 10 % près) sont notés respectivement (●) (■).

Question n°54 : Quel est l'apport des modèles polynomiaux ?

348 Actuellement, un grand nombre d'auteurs utilisent les modèles des contraintes polynomiaux. La mise en place de ces modèles multifactoriels (modèle [5]) est relativement rapide et permet de décrire de manière objective et très précise, l'effet conjugué de plusieurs paramètres environnementaux sur un des paramètres de croissance, le plus souvent, dans un milieu de culture et dans un domaine expérimental très précis. Les surfaces de réponse obtenues ne sont théoriquement utilisables uniquement pour la souche, le milieu, les facteurs et le domaine expérimental étudié.

$$\mu = a_0 + a_1 e_1 + \dots + a_i e_i + a_{11} e_1^2 + a_{12} e_1 e_2 + \dots + a_{ij} e_i e_j + \dots + a_{nn} e_n^2 \quad [5]$$

$0 < i \quad j \quad n$

Avec e_i , les facteurs environnementaux au nombre de n ; a_0 et a_i , les coefficients du polynôme de régression.

349 Cette démarche est celle adoptée par « l'école anglo-saxonne » qui considère que si les facteurs pris en compte sont correctement choisis (température, pH, a_w , concentration en nitrite et en acide lactique...), ces modèles sont susceptibles de décrire la dynamique de la souche dans l'ensemble des produits : la seule prise en compte de ces facteurs suffit à extrapoler le comportement étudié du milieu de culture vers le produit considéré. Cette démarche a conduit à la diffusion de logiciels de simulation comme le « Pathogen Modelling Program » (USA) et le « FoodMicromodel » (GB).

350 Ces modèles comportent des inconvénients majeurs : ils sont généralement surparamétrés donc peu robustes. De fait, il n'est pas possible de généraliser leur usage à des conditions expérimentales différentes de celles qui sont utilisées lors de l'élaboration du modèle car l'hypothèse selon laquelle seuls les facteurs environnementaux choisis suffisent à caractériser un système souche/produit/conditions, est erronée dans de nombreux cas. De plus, sur le plan de la rigueur méthodologique, les paramètres n'ayant pas de signification biologique, toute extrapolation hors du domaine d'étude initial est impossible sans apport d'une connaissance supplémentaire permettant de l'objectiver. De ce fait, avec ce type de modèle des contraintes, le réalisme est souvent sacrifié au profit de la précision.

Question n°55 : Quel est l'état de la connaissance dans le système prévisionnel français ?

351 Le système français de microbiologie quantitative par simulation numérique est fondé sur l'emploi des modèles dynamiques sous contraintes faisant intervenir des modèles des contraintes dont seules les variables cinétiques et/ou opérationnelle (modifiés par l'opérateur) sont prises en compte comme valeur limitante. Les autres facteurs environnementaux spécifiques du produit et constants, sont pris en compte au travers d'un nombre très limité de paramètres dits de référence, spécifiques de l'association d'une souche à un produit donné, **déterminés simplement par une courbe de croissance expérimentale** (l'équivalent d'un « challenge test »). Cette nécessité quasi absolue est une spécificité du système prévisionnel français

et lui garanti une bonne crédibilité. Actuellement les logiciels disponibles sont « ASK_ME » (CNRS UMR 5558, Lyon) et son épigone industriel « Dyn@card » (1998 Danone). Un projet à vocation nationale intitulé PREVIUS, est en cours de construction pour étendre les possibilités d'emploi.

352 « ASK_ME » et « Dyn@card » ont été largement employés et testés en milieu industriel où ils semblent avoir donné entière satisfaction quand ils sont comparés à des situations réelles. Ne prenant pas en compte les interactions, il donnent des résultats « sécuritaires », mais qui peuvent être largement erronés dans le cas de matrices contenant des *Lactobacillus* dont l'effet sur la population de *L. monocytogenes* est autre que celui provoqué uniquement par la diminution de pH induit par la fermentation. En effet, si l'influence de l'acidification peut être pris en compte avec succès par les modèles actuels, il subsiste des lacunes pour la prise en compte d'effets de type interactions bactériennes ou bactériocines. Dans la grande majorité des utilisations, une bonne connaissance de la croissance dans l'aliment reste indispensable tout comme une bonne connaissance de la physiologie bactérienne.

353 L'exemple suivant permet d'apprécier son utilisation :

Pour simuler, dans un aliment entéral (dont on connaît les caractéristiques), l'évolution de *L. monocytogenes*, une connaissance de base est déduite de la littérature. Aucune courbe préliminaire de croissance n'a été obtenue dans ce produit pour évaluer certains paramètres spécifiques de l'association *L. monocytogenes*/produit. Ces paramètres de référence ont été tirés de la littérature.

Les températures cardinales (T_{min} , T_{opt} et T_{max}) ont été estimées en moyenne d'après les différentes valeurs estimées par les auteurs.

Une simulation a été produite à partir du modèle sous contrainte thermique variable (le modèle dynamique utilisé étant le modèle [1]) et pour une contamination initiale du produit déterminée.

Une expérience a ensuite été conduite avec *L. monocytogenes* dans le produit, permettant d'obtenir, à partir de la même densité initiale et des mêmes conditions thermiques, une courbe observée par dénombrement.

La Figure 9 présente la prédiction et les points expérimentaux observés.

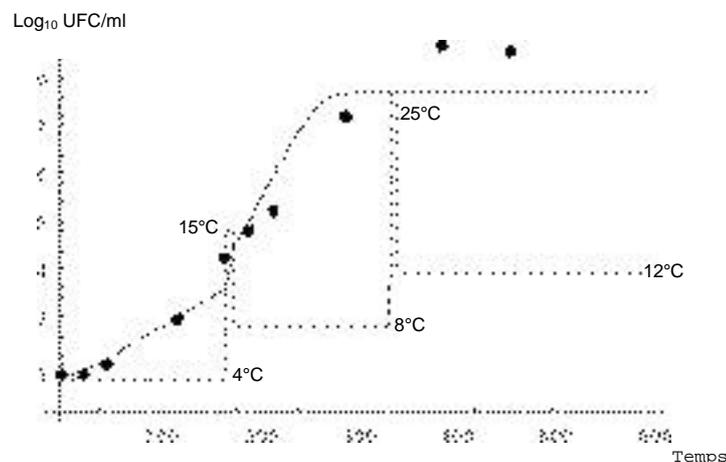


Figure 9 Comparaison d'une simulation et d'une dynamique observée, du développement de *L. monocytogenes* dans un produit entéral en conditions thermiques variables (d'après Rosso 1995).

354 Cet exemple est une illustration de la qualité des résultats obtenus avec une information minimale provenant de la littérature, pour des températures supérieures ou égales à 4°C. A partir de ces paramètres liés à la souche, la prédiction pour une nouvelle situation (autre produit, autres conditions environnementales) est très facile parce qu'elle est rendue objective par l'utilisation de paramètres biologiques pouvant être obtenus indépendamment de l'utilisation des modèles.

Question n°56 : Peut-on utiliser actuellement ces analyses dans l'estimation de la Date Limite de Consommation ?

- 355 Dans de nombreux pays, dont la France, la consommation d'un aliment est considérée comme dangereuse quand une densité de *L. monocytogenes* potentiellement critique est dépassée. Ce seuil est actuellement considéré comme n'étant pas supérieur à 100 *L. monocytogenes*/g.
- 356 Comme pour toute croissance de population bactérienne, cette densité est atteinte après un temps qui ne dépend que de l'importance de la population de départ (contamination initiale ou inoculum initial), de la bactérie (temps de latence, taux de croissance), des contraintes environnementales modifiant les paramètres de croissance de la bactérie (température, acidité, teneur en eau, etc.) et enfin des variations de ces contraintes (variations de température, de pH, de teneur en eau, etc.).
- 357 Les tests de vieillissement, de conservation avec contamination expérimentale (« challenge tests ») consistent à suivre le devenir de la population bactérienne introduite (ou naturellement présente) à un niveau correspondant à la contamination habituelle de l'aliment en fin de production au cours du temps. Pour qu'un tel test soit réaliste, c'est-à-dire qu'il apporte une réelle information sur le comportement des bactéries, il faut que le scénario de vie de l'aliment soit connu ou approximativement connu ; le test cherchera à reproduire fidèlement le scénario de vie en particulier les variations environnementales (mais seule la température peut être réellement modulée lors de ces tests). Le temps que met la bactérie pour atteindre le seuil dangereux permet alors de fixer pour le produit la DLC. Bien entendu une expérience isolée n'a pas beaucoup de sens et le test de vieillissement doit être répété avec divers lots de fabrication, éventuellement avec des souches différentes de la bactérie. Ces points ne sont pas pris en compte dans la norme AFNOR XP V01-003.
- 358 La microbiologie prévisionnelle par simulation numérique permet d'apporter des renseignements complémentaires ou même se substitue aux tests de vieillissement si les paramètres de base de la dynamique des populations bactériennes est connue dans l'aliment concerné. Une étude de contamination expérimentale, selon un protocole simple, permet d'estimer ces paramètres s'ils sont inconnus. La microbiologie prévisionnelle par simulation numérique a le grand avantage de permettre de simuler des scénarios de vie des produits en quelques minutes.
- 359 À titre d'exemple, l'effet d'une contamination variant de 1 à 10 *L. monocytogenes* / 100g dans des préparations alimentaires contenant de la viande et pour un profil thermique donné (avec simulation d'entrées-sorties du réfrigérateur quatre jours après l'achat) est modélisé dans la **Figure 10**.

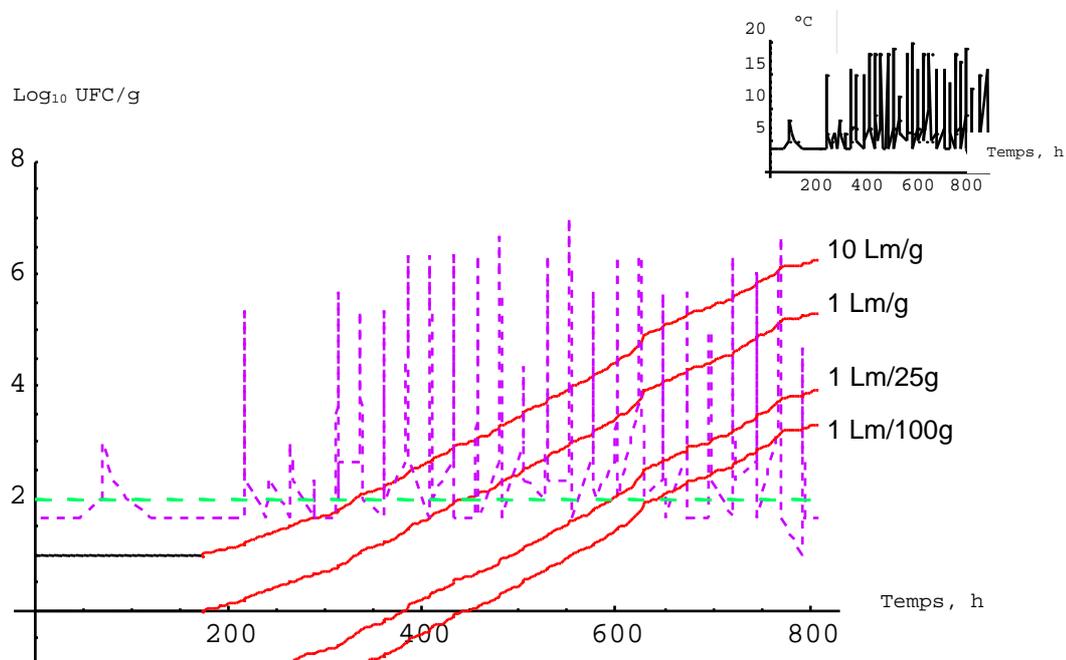


Figure 10 Simulation par le logiciel ASK_ME de l'effet d'une contamination variant de 1 à 10 *L. monocytogenes*/100g dans une préparation alimentaire contenant de la viande et pour un profil thermique donné (en haut à gauche).

- 360 Les DLC théoriques sont alors respectivement de 634, 598, 489, 335 heures pour des contaminations de 1 *L. monocytogenes*/100g, 1 *L. monocytogenes*/25g, 1 *L. monocytogenes*/g et 10 *L. monocytogenes*/g.

Appliquer des méthodes strictes d'hygiène permettant d'abaisser le taux de contamination initial très au-dessous de 1 *L. monocytogenes*/g (1 *L. monocytogenes*/100g) permet ainsi d'assurer plus de 600 heures de conservation en toute sécurité (26 jours) et ceci dans des conditions d'utilisation du produit. Ce gain de conservation est donc une « prime » à la qualité de la fabrication. On voit au passage que les contaminations initiales supérieures ou égales à 1 *L. monocytogenes*/g donnent des DLC qui ne protègent pas le consommateur lors de la phase d'utilisation du produit (les paramètres utilisés sont ceux correspondant à certaines rillettes ou pâtés).

Question n°57 : Peut-on utiliser les données des contrôles pour estimer l'inoculum initial ?

- 361 D'après les données des contrôles 1993-1996 de la DGCCRF, la fréquence à la vente des charcuteries cuites contenant plus de 100 *L. monocytogenes*/g est de 1,1 % et 0,6 % plus de 1000/g. Utilisé en rétro-calcul, le modèle permet de calculer, en connaissant une densité observée en fin de DLC de connaître l'inoculum correspondant au départ du produit.
- 362 Il est possible d'employer les données des contrôles pour calculer les inoculums en fin de production. Ceci nécessite, si l'on désire une bonne précision, une très bonne connaissance des conditions de conservation. Si l'on désire seulement un ordre de grandeur un scénario réaliste de l'évolution thermique peut être utilisé. L'inoculum initial est mieux connu du secteur industriel et il serait nécessaire d'avoir accès à ces données en fin de production.

Question n°58 : Quelles sont les autres applications des simulations numériques ?

- 363 Une approche différente, mais fondée sur les mêmes concepts, a permis de trouver, pour *L. monocytogenes*, une expression simple de la diminution de DLC, à niveau de risque constant, en cas de modification d'une variable environnementale (par exemple augmentation de température, Rosso *et al.* 1996).

SECTION K : APPRÉCIATION DU RISQUE

364 Au cours des dix dernières années ont été publiés de nombreux travaux portant sur l'analyse des risques en microbiologie alimentaire. Les tous premiers travaux publiés restent très conceptuels et ont souvent pour objet la définition des principes généraux à respecter dans une analyse du risque, la clarification de la terminologie employée et l'analyse des difficultés soulevées *a priori* par une telle approche. De cette littérature, ressort un schéma général de l'analyse des risques qui semble faire à peu près l'unanimité des différents auteurs, notamment parce qu'ils correspondent à la démarche retenue par le *Codex Alimentarius* : ceux-ci différencient l'**appréciation quantitative du risque** (« risk assessment ») de l'**analyse du risque** (« risk analysis ») qui comprend non seulement la phase d'appréciation des risques, mais aussi les phases de **gestion du risque** (« risk management ») et de **communication du risque** (« risk communication »). L'appréciation des risques est elle-même classiquement divisée en quatre phases, l'**identification des dangers** (« hazard identification »), l'**évaluation de la loi dose-réponse** (« dose-response assessment »), l'**appréciation de l'exposition** (« exposure assessment ») et la **caractérisation des risques** (« risk characterisation »). Cette dernière phase consiste à mettre en relation tous les résultats obtenus lors des phases précédentes pour en déduire une estimation qualitative ou quantitative du risque pour une population de consommateurs. Parallèlement à des articles conceptuels, des auteurs ont tenté d'aborder l'évaluation des risques sur des cas concrets.

Question n°59 : Comment apprécier l'exposition à *L. monocytogenes* ?

- Estimation de la densité de *L. monocytogenes* dans le lait de vache pasteurisé (Peeler et Bunning 1994, et commentaire associé de Cassin *et al.* 1994)

365 Peeler et Bunning ont publié en 1994 une étude portant sur la phase d'**appréciation de l'exposition**, et plus spécifiquement sur l'**estimation de la densité de *L. monocytogenes* dans le lait de vache après pasteurisation**. Cette estimation prend en compte les sources de contamination du lait par l'animal et par l'environnement, la croissance de *L. monocytogenes* durant le stockage et le transport du lait, et enfin sa destruction thermique au cours de la pasteurisation. Le modèle de croissance n'est pas explicitement décrit, mais semble fondé uniquement sur l'observation expérimentale de trois temps de génération dans le lait correspondant aux températures 4°C, 10°C et 15°C. En ce qui concerne la destruction thermique, quatre procédés différents de pasteurisation sont considérés. Pour chaque procédé, la variabilité des valeurs de la durée de réduction décimale est décrite par une distribution en fréquences, à partir de données issues de la littérature. De la même façon, les auteurs décrivent sous forme de distributions en fréquence la variabilité sur les divers paramètres caractérisant la contamination, le stockage et le transport du lait. À partir de ces distributions, les auteurs tentent d'évaluer la concentration *en L. monocytogenes* atteinte après la pasteurisation.

366 La méthodologie de calcul utilisée dans cet article a été vivement critiquée par Cassin *et al.* (1994) dans une lettre publiée peu après dans le même journal. Cassin *et al.* (1994) ont souligné l'intérêt d'une telle approche, mais ont montré que les calculs réalisés étaient erronés, et qu'il était indispensable, pour tenir compte de la variabilité sur les paramètres pris en compte dans une telle analyse, d'utiliser une méthode de simulation de type « Monte-Carlo ». Notons que cette méthode est effectivement préconisée de façon plus générale pour toute appréciation quantitative du risque.

- Comparaison des consommations alimentaires et de la prévalence des *Listeria* dans les aliments (Hitchins 1995)

367 Cette méthode permet à partir de la connaissance des consommations alimentaires d'une population et de la prévalence d'un germe dans un type donné d'aliment de déterminer *l'exposition annuelle par personne à la présence du germe*, puis *la fréquence d'exposition à une dose infectante*, notamment en croisant les résultats de l'étude précédente avec ceux des statistiques de Listérioses. Cette méthode reste peu précise car il faut souligner :

- le manque d'informations sur le degré de cuisson des aliments, qui conduira à une appréciation peu fiable pour les produits cuits par le consommateur final,
- les informations parcellaires sur le pourcentage d'échantillons positifs dans une famille d'aliments
- les informations parcellaires sur le nombre de *Listeria/g* d'aliment
- la méconnaissance de la population sensible
- la déclaration incomplète des cas de Listériose, qui conduit l'auteur à majorer arbitrairement d'un facteur multiplicatif de 15, le nombre de cas réels par rapport au nombre de cas déclarés.

Question n°60 : Quelle est la prise en compte de la virulence, de ses variations, de la variabilité bactérienne ?

368 Ce point a été envisagé dans une autre section : toutes les souches de *L. monocytogenes* doivent être considérées comme potentiellement pathogènes.

Question n°61 : L'appréciation quantitative du risque dans le cas de la listériose : quelles expériences ?

- Appréciation quantitative du risque de listériose au Canada

369 En 1996, Farber *et al.* ont publié une étude plus générale, portant sur l'appréciation quantitative du risque de listériose au Canada, et intégrant les phases d'identification des dangers, d'évaluation de la loi dose-réponse, d'appréciation de l'exposition et de caractérisation du risque. En ce qui concerne l'évaluation de la loi dose-réponse, étant donné le manque de données expérimentales, un modèle flexible de type Weibull-Gamma a été choisi. Ses paramètres sont estimés pour la population normale et pour la population à risque (supposée correspondre à 20 % de la population totale), à partir de valeurs de doses infections 10 % et 50 % publiées dans la littérature. En ce qui concerne l'évaluation de l'exposition, deux cas sont étudiés de façon différente. Tout d'abord, un modèle de croissance de *L. monocytogenes* dans le pâté de viande est combiné avec la loi dose réponse établie, afin de montrer graphiquement l'impact d'un changement de la température de stockage de 4°C à 8°C sur le risque de listériose. Dans cette partie, le niveau de contamination initial est fixé arbitrairement. Ensuite, une estimation du risque de listériose due à la consommation de fromage à pâte molle est réalisée. Aucun modèle de croissance microbienne n'est cette fois pris en compte, mais l'évaluation de l'exposition est fondée sur des données observées comme la dose de *L. monocytogenes* dans les fromages contaminés, la proportion de fromages contaminés, le nombre de parts consommées et le poids d'une part. Certains de ces paramètres sont définis par un intervalle (intervalle des valeurs observées), d'autres par une valeur unique (valeur moyenne ou la plus souvent observée ?). À partir de la loi dose-réponse et de ces données, le risque de listériose est estimé. L'incidence de ce type de listériose est ainsi prédite par un intervalle très large (entre 10^{-8} et 10^{-3} cas par habitant et par an), reflétant la grande incertitude sur cette estimation. Cet intervalle comprend l'incidence observée au Canada pour ce type de listériose (environ 10^{-6} cas par habitant et par an). Les auteurs remarquent dans leur conclusion que les calculs réalisés sont très simples, et que ce type d'analyse mériterait d'être complexifié en ce qui concerne la méthodologie de prise en compte des incertitudes.

- Utilisation de l'appréciation quantitative du risque pour réduire l'incidence de listériose

370 Miller *et al.* (1997) ont tenté de montrer comment l'appréciation quantitative du risque pouvait être utilisée comme outil d'aide à la prévention du risque de listériose. Cette démonstration repose sur l'appréciation quantitative du risque pour un produit bien spécifique : les boulettes de viande cuites à réchauffer. La loi dose-réponse est décrite de façon très simpliste, en considérant qu'il existe une dose infectieuse fixée ici à 100 cellules viables ingérées. La quantité ingérée est quant à elle fixée à 100 grammes. En ce qui concerne l'évaluation de l'exposition, les différentes étapes de procédé sont décrites depuis la conservation des matières premières jusqu'à la consommation du produit. Chaque étape est définie par sa durée et ses conditions environnementales, supposées constantes par étape. Aucune incertitude n'est prise en compte sur ces caractéristiques. La croissance microbienne est simulée à l'aide du logiciel PMP (« Pathogen Modeling Program ») évoqué précédemment, et la destruction thermique à partir d'un modèle de destruction thermique tiré de la littérature correspondant à des données observées dans le lait. Une incertitude est associée à chaque valeur de temps de latence, taux de croissance ou durée de réduction décimale simulée, mais les valeurs de ces marges d'incertitude semblent fixées arbitrairement. À partir de toutes ces données, et d'une distribution observée de la densité de *L. monocytogenes* sur des carcasses de viande, la méthode de simulation de « Monte-Carlo » est utilisée pour estimer la distribution du niveau microbien obtenu sur le produit au moment de la consommation. Il est ainsi estimé qu'environ 7 % des produits présentent, à la consommation, un niveau en *L. monocytogenes* supérieur à la dose infectieuse. Une seconde simulation est réalisée en modifiant la distribution du niveau de contamination initiale, dans le dessein de montrer l'impact de mesures de limitation de la contamination sur le risque de listériose. Les auteurs suggèrent qu'une telle démarche puisse être utilisée pour tester d'autres mesures de prévention comme l'augmentation de la durée de cuisson. Ils concluent en soulignant la difficulté d'estimation de la variabilité associée à chaque paramètre utilisé dans l'évaluation de l'exposition. Ils mentionnent notamment l'importance que doit avoir sur le risque de listériose la variabilité biologique entre les diverses souches de *L. monocytogenes*.

- **Évaluation quantitative du risque de listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait cru**

371 Bemrah *et al.* (1998) ont tenté d'estimer le risque de listériose lié à la consommation de fromage à pâte molle au lait cru. Comme l'étude de Farber *et al.* (1996), cette étude présente les quatre phases classiques de l'appréciation quantitative des risques. En ce qui concerne l'évaluation de la loi dose-réponse, la démarche décrite par Farber *et al.* (1996) est reprise telle quelle. En ce qui concerne l'évaluation de l'exposition, trois blocs sont étudiés de façon successive : la production laitière, la fabrication fromagère et la consommation. Les différentes variables caractérisant chacun de ces blocs sont décrites par des distributions en fréquences, afin de prendre en compte toutes les sources de variabilité. À partir de ces distributions, une simulation de type « Monte-Carlo » est réalisée sur l'ensemble des blocs. Sur le premier bloc, la méthode de « Monte-Carlo » est utilisée pour estimer la distribution de la densité de *L. monocytogenes* dans le lait cru. Les contaminations par l'animal et par l'environnement sont envisagées. La croissance microbienne est décrite sur trois étapes (2 étapes de stockage et une étape de transport) supposées à conditions environnementales constantes, à partir du modèle décrit par Peeler et Bunning (1994). Sur le deuxième bloc, la distribution de la densité de *L. monocytogenes* dans le fromage est estimée par « Monte-Carlo », d'après les résultats expérimentaux rapportés dans la littérature. Aucune croissance ni décroissance microbienne n'est prise en compte sur ce bloc. Enfin, le risque final est estimé, toujours par « Monte-Carlo », à partir des résultats du bloc précédent, de la loi dose-réponse, et de paramètres caractérisant la consommation (fréquence de consommation et quantité ingérée). Là encore, sur ce dernier bloc, aucune croissance microbienne n'est prise en compte. Cette hypothèse d'absence de croissance microbienne de la fabrication fromagère jusqu'à la consommation semble très optimiste, même en supposant que les fromages sont constamment conservés en conditions réfrigérées. En effet, une croissance de *L. monocytogenes* à la surface de fromages a été reportée à 4°C et 8°C avec des temps de génération respectifs de 4,4 et 2,1 jours. On peut regretter que cette étude ne présente pas d'analyse globale de sensibilité du risque aux différents paramètres étudiés, analyse qui apporte souvent plus d'information que l'estimation du risque en elle-même.

Question n°62 : Quelle est la disponibilité des systèmes et leurs limites d'emploi ?

372 Il n'existe aucune disponibilité à très court terme de systèmes validés. Un modèle d'analyse de risque (non publié) a été utilisé pour défendre la position française dans le projet SCOOP 2 (réglementation des températures des réfrigérateurs industriels).

Question n°63 : Quelles sont les données utilisables de façon fiables et les données absentes ?

- **Évaluation de la loi dose-réponse pour *L. monocytogenes* à partir de données d'épidémiologie-surveillance**

373 Buchanan *et al.* (1997) ont proposé une méthode simple d'évaluation de la loi dose-réponse pour *L. monocytogenes* à partir de données épidémiologiques. Ils supposent que cette loi peut être décrite par le modèle exponentiel. Ce modèle très simple présente l'avantage d'être caractérisé par un seul paramètre. Il est ainsi possible d'estimer ce paramètre à partir de peu de données. Un tel calcul est proposé à partir de l'incidence de listériose observée, de la fréquence de consommation du produit incriminé, de la dose moyenne ingérée de ce produit et de la distribution observée des niveaux de contamination en *L. monocytogenes* dans ce produit. Il est supposé que la listériose ne peut atteindre qu'une sous-population à risque élevé, représentant 20 % de la population totale. Les calculs réalisés sont très simples, et les auteurs précisent que la méthode proposée pourrait être améliorée par utilisation de simulations de type « Monte-Carlo ». Un exemple est traité à partir de données épidémiologiques recueillies en Allemagne. Dans cet exemple, des données moyennes relatives à la consommation de saumon fumé sont utilisées (20 portions de 50 g consommées par habitant et par an en moyenne), et il est supposé, de façon surprenante, que tous les cas de listériose recensés, sont liés à la consommation de ce produit.

- **Étude expérimentale chez la souris de la loi dose-réponse pour *L. monocytogenes***

374 Notermans *et al.* (1998) ont tenté de trouver la cause de la faible incidence de listériose chez l'homme et d'expliquer le décalage entre l'exposition régulière des consommateurs à *L. monocytogenes* et la faible incidence de listériose. Ces calculs sont réalisés à partir de données observées relatives à la contamination et à la consommation de certains produits prêts à consommer.

Question n°64 : Quelle est la fiabilité des expériences actuelles ?

375 Les expériences en sont au stade initial et cherchent à mettre en place des concepts.

Question n°65 : Peut-on utiliser actuellement ces analyses dans l'estimation du seuil maximal admissible ?

376 Les expériences à venir devraient permettre d'approcher une estimation de la loi dose-réponse. Ceci, par la relation entre dose et consommation, devrait permettre de vérifier les hypothèses comme celles qui concernent l'innocuité des aliments contenant moins de 100 *L. monocytogenes*/g pour la majorité de la population à risque.

Question n°66 : Que faudrait-il pour arriver à ce but ?

377 De manière générale, l'appréciation quantitative des risques ne repose pas toujours sur une démarche permettant de s'assurer de la valeur réaliste des résultats. En effet, pour parvenir à cet objectif, il est indispensable de construire cette appréciation selon une démarche en trois grandes étapes : descriptive/exhaustive, sélective, rétroactive/évolutive.

378 Une étape de description exhaustive est en premier lieu nécessaire. Cette étape a pour objectif de décrire le processus dans sa complexité sans *a priori* sur l'importance de tel ou tel facteur sur la valeur du résultat final, et donc en prenant en compte l'ensemble des facteurs susceptibles d'influencer la valeur du risque. Cette description se traduit par un relevé de tous les facteurs potentiellement limitants, et de leur variabilité, et d'une capacité à intégrer ces facteurs dans le formalisme utilisé. C'est ainsi, qu'il est important de prendre en compte dans les modèles, la variabilité biologique des souches de *L. monocytogenes* notamment en termes d'aptitude à la multiplication. À ce stade de l'analyse, une approche floue de ces facteurs est suffisante à condition que soit introduite une connaissance d'expert conduisant à définir correctement les domaines de possibilité, pour chacun d'entre eux.

379 Dans un second temps, une étape sélective consiste à effectuer une analyse statistique des effets relatifs de chaque facteur et de leur domaine de variabilité (et d'incertitude) sur la valeur du résultat final. Cette analyse permet d'identifier les « facteurs clés » c'est-à-dire ceux qui ont le plus d'influence sur le risque. Cette approche sélective, doit orienter des campagnes de mesures et d'observation permettant d'obtenir, pour ces facteurs clés, un domaine plus précis de valeurs (médiane, moyenne, distribution). En effet, si la première étape est une étude relative pour laquelle, si les modèles sont robustes, une description floue suffit, cette seconde étape conduit à une appréciation quantitative proprement dite avec son incertitude, obtenue en ayant au préalable précisé les valeurs des facteurs majeurs.

380 Il est important, enfin, que la méthode et le formalisme utilisé permettent d'atteindre la troisième étape qui est rétroactive et évolutive, c'est-à-dire que, sur la base d'une confrontation des valeurs de risques obtenus et de leur incertitude avec les données épidémiologiques disponibles, le système puisse être amélioré et donc évoluer en conséquence.

BIBLIOGRAPHIE

- Abd El-Ghaffar, S.Kh. and Abd-Elgwad, A.M. (1997). Some studies on *Listeria monocytogenes* in rabbits. Assiut. Vet. Med. J. **38**: 15-27.
- Adams, T.J., Vartivarian, S. and Cowart, R.E. (1990). Iron acquisition systems of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **58**: 2715-2718.
- Adesiyun, A.A., and Krishnan, C. (1995). Occurrence of *Yersinia enterocolitica* O:3, *Listeria monocytogenes* O:4 and thermophilic *Campylobacter* spp. in slaughter pigs and carcasses in Trinidad. Food Microbiol. **12**: 99-107.
- Al –Azawi, A.M. (1999). Presence of *Listeria* species in tadle eggs at Baghdad markets. Dirasat. Agric. Sciences **26**(1) : 114-116.
- Al-Ghazali, M.R. and Al-Azawi, S.K. (1988). Storage effects of sewage sludge cake on the survival of *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Bacteriol. **65**: 209-213.
- Al-Ghazali, M.R. and Al-Azawi, S.K. (1990). *Listeria monocytogenes* contamination of crops grown on soil treated with sewage sludge cake. J. Appl. Bacteriol. **69**: 642-647.
- Allock, J.G. (1992). Cutaneous listeriosis. Vet. Rec. **130**: 18-19.
- Al-Makhafi, H., McGuire, J. and Daeschel, M. (1994). Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. App. Environ. Microbiol. **460**: 3560-3565.
- Amtsberg, G.M. (1979). Epidemiologie und Diagnostik listeriose. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. **86**: 253-257.
- Anonymous (1993). Qualité microbiologique des produits végétaux dit de la « 4ème gamme ». Rapport d'Activité des Laboratoires de la DGCCRF, pp 54.
- Anonymous (1998a). Le plan de surveillance 1993-1996 de la contamination des aliments par *Listeria monocytogenes*. Le point sur ... n°9 DGCCRF, Ministère de l'Economie, des Finances et de l'Industrie
- Anonymous (1998b). Référentiel en microbiologie médicale. Groupe Rémic de la Société Française de Microbiologie. 1^{re} édition, pp. 147
- Anonymous (1999a). Epidémiologie des maladies infectieuses en France. Situation en 1997 et tendances évolutives récentes ; Infections invasives à *Haemophilus influenzae*, *Listeria monocytogenes*, méningocoque, pneumocoque, straptocoques A et B en France en 1997. In: Bulletin épidémiologique annuel. Réseau National de Santé Publique, Saint-Maurice, France : 155-160.
- Anonymous (1999b). Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*, European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. 23 September 1999, pp. 47.
- Arimi, S.M., Ryser, E.T., Pritchard, T.J. and Donnelly C.W. (1997). Diversity of *Listeria* ribotypes recovered from dairy cattle, silage, and dairy processing environments. J. Food Protect. **60** (7) : 811-816.
- Arnold, G.J. and Coble, J. (1995). Incidence of *Listeria* species in foods in NSW. Food Austral. **47**: 71-75.
- Arumugaswamy, R.K., Rahamat Ali, G.R. and Abd Hamid, S.N.B. (1994). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. **23**: 117-121.
- Arizcun C., Vasseur C. and Labadie J. (1998). Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. J. Food Prot. **61**: 731-734.
- Asahi, O., Hosada, T. and Akiyama, Y. (1957). Studies on the mecanism of infection of the brain with *Listeria monocytogenes*. Am. J. Vet. Res. **18**: 147-157.
- Audurier, A., Rocourt, J. and Courtieu, A.L. (1977). Isolement et caractérisation de bactériophages de *Listeria monocytogenes*. Ann. Microbiol. (Inst Pasteur) **128A**:185-198
- Audurier, A., Pardon, P., Marly, J. and Lantier, F. (1980). Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *L. innocua*. Ann. Microbiol. (Paris) **131**: 47-57.
- Augustin, J.-C. (1999). Modélisation de la dynamique de croissance des populations de *Listeria monocytogenes* dans les aliments. Thèse de Doctorat, Université Lyon 1.
- Augustin, J.-C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. and Carlier, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *L. monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **66**: 1706-1710.
- Aujard, Y., Bedu, A, Mariani-Kurkdjian, P., Baumann, C. and Boissinot, C. (1995). Neonatal listeriosis. Med. Mal. Infect. **25**: 238-243.

- Aureli, P., Giovanni, C.F., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L. and Salmaso, S. (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N. Engl. J. Med.* **342**: 1236-41.
- Ayaz, Y. and Aksay, E. (1995). Detection of *Listeria* species in milk and milk products in Ankara. *Etilik Vet. Mikro. Dergisi.* **8** (1/2): 1-18.
- Bailey, J.S., Fletcher, D.L. and Cox, N.A. (1989). Recovery and Serotype Distribution of *Listeria monocytogenes* from Broiler Chickens in the Southeastern United States. *J. Food Protect.* **52** (3): 148-150.
- Bajard, S., Rosso, L., Fardel, G. and Flandrois, J.P. (1996). The particular behaviour of *Listeria monocytogenes* under sub-optimal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* **29**: 201-211.
- Baldrige, J. R., Barry, R. A. and Hinrichs, D. J. (1990). Expression of systemic protection and delayed-type hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* is mediated by different T-cell subsets. *Infect. Immun.* **58**: 654-661.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 277-294.
- Barber, M.A. (1908). The rate of multiplication of *Bacillus coli* at different temperatures. *J. Infect. Dis.* **5**: 379-400.
- Bassler, H.A., Flood, S.J.A., Livak, K.J., Marmaro, J., Knorr, R. and Batt, C.A. (1995). Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** : 3724-3728.
- Bazin, C., Lamière, S., Le Bigot, P., Ginies, G., Vachon F. and Vic-Dupont, V. (1977). Etude clinique de 50 cas de listériose neuroméningée de l'adulte. *Méd. Mal. Infect.* **7**: 26.
- Beaman, B. L. and Ogata, S. A. (1993). Ultrastructural analysis of attachment to and penetration of capillaries in the murine *pons, midbrain, thalamus, and hypothalamus* by *Nocardia asteroides*. *Infect. Immun.* **61**: 955-965.
- Beaman, L. and Beaman, B. L. (1993). Interactions of *Nocardia asteroides* with murine glia cells in culture. *Infect. Immun.* **61**: 343-347.
- Beaufort, A., Poumeyrol, G. and Rudelle, S. (1992). Fréquence de contamination par *Listeria* et *Yersinia* d'une gamme de produits de 4ème gamme. *Rev. Gen. Froid* **82**(3): 28-31.
- Beauregard, K. E., Lee, K. D., Collier, R. J. and Swanson, J. A. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **186**: 159-63.
- Beckers, H.J., In't Veld, P.H., Soentoro, P.S.S. and Delfgou-van Asch, E.H.M. (1989). The occurrence of *Listeria* in food. In: *Foodborne Listeriosis: Proceedings of a Symposium on September 7, 1988 in Wiesbaden, Germany.* B. Behr's Verlag GmbH&Co, Hamburg, pp. 83-97.
- Bégot, C., Lebert, I. and Lebert, A. (1998). Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. *Food Microbiol.* **14**: 403-412.
- Belding, R.C. and Mayer, M.L. (1957). Listeriosis in the Turkey. Two case reports. *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **15**: 296-297.
- Belin, M. (1946). La listerellose équine. *Bull. Acad. Vét.* **13**: 176-181.
- Belin M. and Lagriffoul, A. (1943). La listerellose ovine. Premiers cas constatés en France. *Bull. Acad. Vét.* **9**: 376-379.
- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M.H., Griffiths, M.W. and Cerf, O. (1998). Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk *Listeria monocytogenes* contamination of bovine milk and soft cheeses. *Prev. Vet. Med.* **37**: 129-145.
- Ben Embarek, P.K. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 17-34.
- Berche, P. (1995). Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* **18**: 323-336.
- Berche, P., Gaillard, J.L., Geoffroy, C. and Alouf, J.E. (1987). T cell recognition of listeriolysin O is induced during infection by *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **139**: 3813-3832.
- Berche, P., Gaillard, J.L. and Sansonetti, P. (1987). Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for *in vivo* induction of T cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **138**: 2266-2271.
- Berche, P., Decreusefond, C., Theodorou, I. and Stiffel, C. (1989). Impact of genetically-regulated T cell proliferation on acquired resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* **132**: 932-939.

- Berche, P., Reich, K., Bonnichon, M., Beretti, J. L., Geoffroy, C., Raveneau, J., Cossart, P., Gaillard, J.L., Geslin, P., Kreis, H. and Véron, M. (1990). Detection of anti-listeriolysin O for serodiagnosis of human listeriosis. *The Lancet* **335**: 624-627.
- Bernagozzi, M., Bianucci, F., Sacchetti, R. and Bisbini, P. (1994). Study of the prevalence of *Listeria spp.* in surface water. *Zbl. Hyg.* **196**: 237-244.
- Berrang, M.E., Frank, J.F. and Brackett, R.E. (1988). Behavior of *Listeria monocytogenes* in chocolate milk and ice cream mix made from post-expiration date skim milk. *J. Food Prot.* **51**: 823.
- Best, M.S., Kennedy, M.E. and Coates, F. (1990). Efficacy of a variety of disinfectants against *Listeria spp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(2): 377-380.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. (1990). Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1734-1742.
- Beuchat, L.R. and Brackett, R.E. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and process tomato products. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1367-1371.
- Beuchat, L.R. and Golden, D.A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* **43**: 134-142.
- Beumer, R.R., Te Giffel, M.C. Spoorenberg, E. and Rombouts, F.M. (1996). *Listeria* species in domestic environments. *Epidemiol. Infect.* **117**(3): 437-442.
- Bhunia, A. K., Westbrook, D. G., Story, R. and Johnson, M. G. (1995). Frozen stored murine hybridoma cells can be used to determine the virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 3349-51.
- Bibb, W.K., Gellin, B.G., Weaver, R., Schwartz, B., Plikaytis, B.D., Reeves, M.W., Pinner, R.W. and Broome, C.V. (1990). Analysis of clinical and food-borne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of polymorphic of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 3126-3129.
- Bienfet, V., Lomba, F. and Binot, H. (1969). Une affection en recrudescence ou trop souvent méconnue ? L'encéphalite bovine à *Listeria monocytogenes*. *Ann. Méd. Vét.* **6**: 345-357.
- Biester, H. and Schwartz, L. (1939a). Etudes sur l'infection à *Listerella* chez le mouton. *J. Inf. Dis.* LXIV **135** (Res. Rev. Méd. Vét. 1940, 335).
- Biester, H.E. and Schwarte, L.H. (1939b). Studies on listerella infection in sheep. *J. Infect. Dis.* **64**: 135-144.
- Biester, H. E. and Schwarte, L.H. (1940). *Listerella* Infection in swine. *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **3**: 339-342.
- Bigelow, W.D. (1920). The logarithmic nature of thermal death time curves. *J. Infect. Dis.* **27**: 528-536.
- Bigelow, W.D. and Esty, J.R. (1920). The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms. *J. Infect. Dis.* **27**: 602-617.
- Bille, J. (1990). Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller, A.J., Smith, J.L., Somkuti, G.A. (ed). *Foodborne listeriosis*. Society for Industrial Microbiology, Elsevier, N.Y.
- Bind, J.L. (1989). La listeriose. *Bull. G.T.V.* **89**(5): 59-77.
- Bind, J.L. and Delaval, J. (1993). Epidémiologie de *Listeria monocytogenes* chez les organismes vivants et dans le milieu extérieur. *Epidémiol. Santé anim.* **24**: 17-26.
- Bind, J.L. and Delaval, J. (1994). Les Listérioses. *Bull. Soc. Vét. Prat.* **78**(6,7): 387-407.
- Bjorland, J. and Gronstol, H. (1995). Listeriose has storfe Norsk. *Veterinaertidsskrift.* **107**: 1129-1139.
- Black, S.S., Austin, F.W. and McKinley, E (1996). Isolation of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Listeria monocytogenes* serotype 4 from a gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*) with canine distemper. *J. Wild. Dis.* **32**(2): 362-366.
- Blanot, S., Muffat-Joly, M., Vilde, F., Clement, O., Frija, G. and Berche, P. (1997). Experimental rhombencephalitis in gerbils due to *Listeria monocytogenes*. *Microb. Pathog.* **23**: 39-48.
- Blanot, S., Boumaila, C. and Berche, P. (1999). Intracerebral activity of antibiotics against *Listeria monocytogenes* during experimental rhombencephalitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**(4): 565-568.
- Blaszyk, M. and Holley, R.A. (1998). Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 76-183.
- Blenden, D.C, Gates, G.A. and Khan, M.S. (1968). Growth of *Listeria monocytogenes* in a corn silage extract medium. *Ann. J. Vet. Res.* **29**: 2237-2242.
- Boerlin, P., Bannerman, E., Ischer, F., Rocourt, J. and Bille, J. (1995). Typing *Listeria monocytogenes* : a random amplification of polymorphic DNA with 5 other methods. *Res. Microbiol.* **146**: 5-49.
- Boerlin, P., Boerlin-Petzold, F., Bannerman, E., Bille, J. and Jemmi, T. (1997). Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1338-1343.

- Bonardi, S., Bottarelli, A., Fusaro, S., Bentley, S., Gnappi, A. and Morini, A. (1997). Epidemiological investigation on *Listeria spp.* in a bovine slaughterhouse. *Ann. Della. Fac di Med. Vet. Unit di Parma* **17**: 181-188.
- Bortolussi, R., Campbell, N. and Krause, V. (1984). Dynamics of *Listeria monocytogenes* type 4b infection in pregnant and infant rats. *Clin. Invest. Med.* **7**: 273-279.
- Bosseray, A., Bouchard, O., Mallaret, M.R. Mallaret, Leclercq, P., Lemoine, J.P. and Micoud, M. (1995). Is listeriosis a problem for physicians ? Results of prospective survey. *Med. Mal. Infect.* **25**: 257-265.
- Boussouel, N. (1998). Le système Lactoperoxydasique (LPS) : caractérisation, amélioration de son efficacité antibactérienne et recherche de combinaisons LPS-Nisine à activité anti-*Listeria monocytogenes*. Thèse INPL, Nancy.
- Boussouel N, Mathieu F, Benoit V, Linder M, Revol-Junelles AM and Milliere, JB. (1999) Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxydase system, Nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 642-52.
- Bouttefroy, A., Le Maître, J.P. and Rousset, A. (1997). Prevalence of *Listeria (sp)* in droppings from urban rooks (*Corvus frugilegus*). *J. Appl. Microbiol.* **82**(5): 641-647.
- Bouwer, H. G. A., Nelson, C. S., Gibbins, B. L., Portnoy, D. A. and Hinrichs, D. J. (1992). Listeriolysin O is target of the immune response to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **175**: 1467-1471.
- Brackett, R.E. (1987). Antimicrobial effect of chlorine on *Listeria monocytogenes*. *Food Prot.* **50**: 999-1003.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L. and Tomassone R. (1998). Model of the influence of time and mild temperature on *Listeria monocytogenes* nonlinear survival curves. *Int. J. Food Microbiol.* **40**: 185-195.
- Breer, C. and Baumgartner, A. (1992). Vorkommen und Verhalten von *Listeria monocytogenes* auf Salaten und Gemüse sowie in frischgepreßten Gemüsesäften. *Arch. Lebensmittelhyg.* **43**: 97-120.
- Breer, C. and Schopfer, K. (1989). Listerien in Nahrungsmitteln. *Schweiz.Med. Wschr.* **119**: 306-311.
- Brehm, K., Ripio, M.-T., Kreft, J. and Vazquez-Boland, J.-A. (1999). The bvr of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. *J. Bacteriol.* **181**: 5024-5032.
- Breidt, F., Henry, P. and Fleming, H.P. (1998). Modeling of the competitive Growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3159-3165.
- Bremer, P.J. and Osborne, C. (1995). Efficacy of marinades against *Listeria monocytogenes* cells in suspension or associated with green shell mussels. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(4): 1514-1519.
- Brett, M.S.Y., Short, P. and McLauchlin, P. (1998). A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels. *Int. J. Food Microbiol.* **43**(3): 223-229.
- Briandet, R., Leriche V., Carpentier B. and Bellon-Fontaine M.N. (1999a). Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells and their adhesion to stainless steel. *J. Food Prot.* **62**: 994-998.
- Briandet, R., Meylheuc, T., Malher, C. and Bellon-Fontaine, M.-N. (1999b). *Listeria monocytogenes* Scott A : cell surface charge, hydrophobicity en electron-donor/electro-acceptor characteristics in different environmental growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 5328-5333.
- Brosch, R., Catimel, B., Milon, G., Buchrieser, C., Vindel, E. and Rocourt, J. (1993). Virulence heterogeneity of *L. monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. *J. Food. Prot.* **56**: 296-301
- Brosch, R., Chen, J. and Luchansky, J.B. (1994). Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic division for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2584-2592.
- Brugere-Picoux, J. (1994). La listériose ovine. *Bull. G.T.V.* **3**: 65-69.
- Brunt, L.M., Portnoy, D.A. and Unanue, E.R. (1990). Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8⁺ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J. Immunol.* **145**: 3540-3546.
- Buchanan, R.L. and Phillips, J.G. (1990). Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **53**: 370-376.
- Buchanan, R.L., Damert, W.G., Whiting, R.C. and Van Schothorst, M. (1997). Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J. Food Protect.* **60**: 918-922.
- Buchanan, R.L., Stahl, H.G. and Whiting R.C. (1989). Effects and interactions of temperature, pH, atmosphere, sodium chloride, and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **52**: 844-851.

- Cain, D.B. and McCann V.L. (1986). An unusual case of cutaneous listeriosis. *J. Clin. Microbiol.* **23**: 976-977.
- Camilli, A., Tilney, L. G. and Portnoy, D. A. (1993). Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **8**: 143-157.
- Canton, P., May, T. and Hoen, B. (1995). Human listeriosis : diagnostic issues. *Med. Mal. Infect.* **25**: 244-250.
- Carbonnelle, B., Cottin, J., Parvery, F., Chambreuil, G., Kowyounnudjiarr, S., Le Linzin, M., Cordier, D. and Vincent, F. (1978). Epidémie de listériose dans l'ouest de la France 1975-1976. *Rev. Epidemiol. Santé Publique* **26**: 451-467.
- Carter, P. B. and Collins, F. M. (1974). The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.* **139**: 1189-1203.
- Cassin, M.H., Paoli, G.M., McColl, R.S. and Lammerding, A.M. (1994). A comment on 'Hasard assessment of *Listeria monocytogenes* in the processing of bovine milk'. *J. Food Protect.* **57**:689-697.
- Catteau, M. (1996). Le genre *Listeria*. Dans : Microbiologie alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la qualité et de la sécurité des aliments. Lavoisier Tec-Doc. pp94-103.
- Chand, P. and Sadana, J.R. (1999). Outbreak of the *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Vet. Rec.* **145**: 83-84.
- Charpentier E. and Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria spp.* *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2103-2108.
- Charton, A., Lecoanet, J., Faye, P. and Patte, F. (1962). Etiologie d'une enzootie de listériose ovine. *Rev. Méd. Vét. T.CXXXVIII* **11**: 927-940.
- Chasseignaux, E. (1999). Ecologie de *Listeria monocytogenes* dans les ateliers de transformation de viandes de volailles et de porcs. Thèse de l'université Claude Bernard – LYON I. 12 Octobre 1999.
- Chasseignaux, E., Toquin, M.T., Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., and Ermel, G. (2000). Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from environments, raw meat and raw products in a poultry processing plant and a pork processing plant. *J. Appl. Microbiol* (accepted).
- Chaubeau-Duffour, C. (1994). *Listeria*. *Bull. G.T.V.* **4**: 57-63.
- Cheftel, J.C. and Culioli, J. (1997). Effects of High pressure on meat : A review. *Meat Sci.* **46**(3): 211-236
- Chen, N. and Shelef, L.A. (1992). Relationship between water activity, salts of lactic acid and growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *J. Food Protect.* **55**: 574-578.
- Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C. and Lebert, A. (1998) Effects of pH and aw stress on growth of *L. monocytogenes*. *Int. J. Food. Microbiol.* **42**: 71-77.
- Cheve, J. and Gauthier, J.L. (1961). La listériose animale dans le département de la Dordogne. Listériose bovine, ovine et aviaire. *Rec. Méd. Vét. T.CXXXVII.* 501-510.
- Clegg, F.G. and Blandford, T.B. (1965). *Vet. Rec.* **77**: 909-910.
- Combril, P., Bertail, P. and Boizot C. (1997). La consommation alimentaire en 1993: distribution des quantités consommées à domicile. OCA INRA, Laboratoire de Recherche sur la Consommation.
- Conlan, J. C. and North, R. J. (1991). Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* **174**: 741-744.
- Conner, D.E., Scott, V.N. and Bernard, D.T. (1990). Growth, inhibition and survival of *Listeria monocytogenes* as affected by acidic conditions. *J. Food Protect.* **53**: 652-655.
- Cordy, D. R. and Osebold, J. W. (1959). The neuropathogenesis of *Listeria* encephalomyelitis in sheep and mice. *J. Infect. Dis.* **104**: 164-173.
- Cornell, K. A., Bouwer, H. G., Hinrichs, D. J. and Barry, R. A. (1999). Genetic immunization of mice against *Listeria monocytogenes* using plasmid DNA encoding listeriolysin O. *J. Immunol.* **163**(1): 322-329.
- Correge I. (1997). Incidence des opérations d'abattage et de découpe des porcs sur la contamination par *Listeria monocytogenes*. *Viandes et Produits Carnés.* **18**: 275-282.
- Cossart, P., M. Vicente, F., Mengaud, J., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C. and Berche, P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes* : direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* **57**: 3629-3636.
- Cotter, P.D., Emerson, N., Gahan, C.G. and Hill, C. (1999). Identification and disruption of *lisRK*, a genetic locus encoding a two-component signal transduction system involved in stress tolerance and virulence in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol* **181**: 6840-6843.
- Cottureau, P. (1972). Les incidences de l'alimentation à base d'ensilage sur les productions et la santé des bovins. *Rev. Méd. Vét. T.CXXIII.* **2**: 147-167.

- Coulanges, V., Andre, Ph., Ziegler, O., Buchheit, L. and Vidon, D.J-M. (1997). Utilisation of Iron-catecholamine complexes involving ferric reductase activity in *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **65**: 2778-2785.
- Cowart, R.E. (1987). Iron regulation of growth and hemolysin production by *Listeria monocytogenes*. *Ann. Inst. Pasteur (Microbiol.)* **138**: 246-249.
- Cowart, R.E. and Foster, B.G. (1981). The role of iron in the production of hemolysin by *Listeria monocytogenes*. *Curr. Microbiol.* **6**: 287-290.
- Cowart, R.E. and Foster, B.G. (1985). Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanisms of acquisition. *J. Infect. Dis.* **151**: 721-730.
- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkell, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. and Siebenga, A. (1989). *Listeria spp.* in food processing non-food and domestic environments. *Food Microbiol.* **6**: 49-53.
- Curiale, M.S. and Lewus, C. (1994). Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. *J. Food Protect.* **57**: 1048-1051.
- Czuprynski, C. J. and Brown, J. F. (1990). Effects of purified anti-Lyt-2 Mab treatment on murine listeriosis comparative roles of Lyt-2+ and L3T4+ cells in resistance to primary and secondary infection, delayed-type hypersensitivity and adoptive transference of resistance. *Immunol.* **71**: 107-111.
- Czuprynski, C.J., Brown, J.F. and Roll, J.T. (1989). Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. *Microb. Pathogen.* **7**: 213-223.
- Czuprynski, C.J., P.M. Henson, S. and Campbell, P.A. (1984). Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. *J. Leukoc. Biol.* **35**: 193-208.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M. E. and Griffin, P. M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* **336**: 100-105.
- Danielsson-Tham, M.L., Prag, M., Rocourt, J., Seeliger, H., Tham, W. and Vikerfors, T. (1997). A fatal case of *Listeria* endocarditis in a man following his tending of goats suggests an Epidemiological link which is not supported by the results. *J. Vet. Med. B* **44**: 253-256.
- Dash, P.K., Matik, S.V.S., Sharma, A.K. and Satya, P. (1998). Management of circling syndrome in pigs. *Indian J. Comp. Microb. Immun. Infect. Dis.* **19** (2): 102-103.
- De Chastellier, C. and Berche, P. (1994). Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages : evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infect. Immun.* **62**: 543-553.
- De Simon, M., Tarrago, C. and Ferrer, M.D. (1992). Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* **16**: 153-156.
- De Valk, H.M., Vaillant, V., Pierre, V., Rocourt, J., Jacquet, Ch., Lequerrec, F., Thomas, J.C. and Goulet, V. (1998). Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis. Halifax, Canada, June 28 - July 2.
- De Valk, H.M., Rocourt, J., Lequerrec, F., Jacquet, Ch., Vaillant, V., Portal, H., Pierre, O., Pierre, P., Stainer, F., Salvat, G. and Goulet, V. (2000). Bouffée épidémique de listériose liée à la consommation de rillettes. France, Octobre-décembre 1999. Synthèses des données disponibles au 12/01/2000. *BEH* **4**: 15-16.
- Dedié (1958). Listeriosis in animals in listeriosis symposium by Roots et coll. Beiheft. 1 zum Zentralblatt für veterinärmedizin. Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg.
- Degen, R. (1972). Involvement of the central nervous system in neonatal listeriosis. *Acad. Sci. Hung.* **19**: 411-417.
- Deneer, H.G. and Boychuk, I. (1993). Reduction of ferric iron by *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria*. *Can. J. Microbiol.* **39**: 480-485.
- Deneer, H.G., Healey, V. and Boychuk, I. (1995). Reduction of exogenous ferric iron by a surface-associated ferric-reductase of *Listeria spp.* *Microbiology* **141**: 1985-1992.
- Dieuleveux, V., Van Der Pyl, D., Chataud, J. and Gueguen, M. (1998). Purification and Characterization of Anti-*Listeria* Compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 800-803.
- Dijkstra, R.G. (1982). The occurrence of *Listeria monocytogenes* in surface water of canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents of canals of a sewage treatment plant. *Zbl. Bakteriologie. Hyg. I. Abt. Orig. B.* **176**: 202-205.
- Dijkstra, R.G. (1989). Ecology of *Listeria* - epidemiological studies on listeriosis in animals and its relationship to food and man. *Microbiol. Alim. Nutr.* **7**: 353-359
- Dijkstra, R.G. and De Vries, J. (1962). Un cas remarquable de listériose chez le mouton *Tijdschrift voor Diezgeneeskunde* **87**: 711-714. (*Res. Rev. Med. Vet.* 1962, 903-904).

- Dillon, R.M., Patel, T.R. and Ratman, S. (1994). Occurrence of *Listeria* in hot and cold-smoked seafood products. *Int. J. Food Microbiol.* **22**: 73-77.
- Donald, A.S., Fenton, D.R. and Seddon, B. (1995). The relationship between ecophysiology, indigenous microflora and growth of *Listeria monocytogenes* in grass silage. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 141-148.
- Donker-Voët, J. (1965). Listeriosis in Animals. *Bull. Off Int. Epiz.* **64**: 757-764.
- Dons, L., Olsen, J.E. and Rasmussen, O.F. (1994). Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *DNA Seq.* **4**(5): 301-11
- Doyle, L.P. (1932). Encephalitis in sheep. *J. Am. Vet. Assoc.* **81** : 118.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni P. and Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of InlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol. Microbiol.* **16**: 251-261.
- Dramsi, S., Kocks, C., Forestier, C. and Cossart, P. (1993). Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol. Microbiol.* **9**: 931-941.
- Drevets, D.A. (1998). *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect. Immun.* **66**: 232-238.
- Drevets, D. A. (1999). Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. *Infect. Immun.* **67**: 3512-3517.
- Duee, J.P. and Moine, G. (1964). Nouveau cas d'avortement à *Listeria* de la lapine. *Bull. Soc. Vét. Prat.* **6**: 240-243.
- Duffes, F. (1999). Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. *Trends Food Sci. Technol.* **10**: 211-216.
- Duffy, L.L., Vanderlinde, P.B. and Grau, F.H. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats : effects of pH, aW, nitrite and ascorbate. *Int. J. Food Microbiol.* **23**: 377-390.
- Duh, Y.-H. and Schaffner, D.W. (1993). Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **56**: 205-210.
- Dunn, P. L. and North, R. J. (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.* **59**: 2892-2900.
- Dutta, P.K. and Malik, B.S. (1981). Isolation and characterization of *listeria monocytogenes* from animals and human beings. *Indian J. Animal Sci.* **51**: 1045-1052.
- Edelson, B. T., Cossart, P. and Unanue, E. R. (1999). Cutting Edge: Paradigm Revisited: Antibody Provides Resistance to *Listeria* Infection. *J. Immunol.* **163**: 408-409.
- Eieland, E. and Finborud, J. (1950). *Listerella monocytogenes* infeksjon hos en san i Sor-Trondelag. *Nord. Vet. Med.* **2**: 19-22.
- Eklund, M.W., Poysky, F.T., Paranjpye, R.N., Lashbrook, L.C., Peterson, M.E. and Pelroy, G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J. Food Protection* **58**: 502-508.
- Ennahar S., Aoude-Werner D., Sorokine, O., Van Dorsselaer A., Bringel, F., Hubert J.C. and Hasselmann C. (1996). Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE92 isolated from cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4381-4387.
- Eppert, I., Valdes-Stauber, N., Gotz, H., Busse, M. and Scherer, S. (1997). Growth reduction of *Listeria spp.* caused by undefined industrial red smear cheese cultures and bacteriocin-producing *Brevibacterium linens* as evaluated in situ on soft cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4812-4817.
- Erdogan, H.M., Cetinkaya, B., Green, L.E., Cripps, P.J. and Morgan, K.L. (1997). Frequency of clinical listeriosis in dairy cattle in England. *Epidémiol. santé anim.* **96**: 31-32.
- Ericsson, H., Eklow, A., Danielsson-Tham, M.L., Loncarevic, S., Mentzing, L.O., Persson, I., Unnerstad, H. and Tham, W. (1997). An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. *J. Clin. Microbiol.* **35**(11): 2904-2907.
- Ermel, G., Salvat, G., Ragimbeau, C. Giovannaci, I. and Toquin, M.T. (1997). Origin of *Listeria monocytogenes* in fresh pork meat production and further processing. Proceedings of the 48th EAAP meeting. Vienna. August 1997.
- Evan-Jones, T. (1953). *Listeria monocytogenes* infection in a fowl. *The Austr. Vet. J.* **2**: 41-42.
- Eveleth, D.F., Goldsby, A.I. and Jennyturn, F. (1953). Listeriosis of swine. *Veterin. Med.* **48**: 82-83.

- Farber, J. M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. **55**: 476-511.
- Farber, J. M. and Speirs, J.I. (1987). Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. J. Clin. Microbiol. **25**: 1463-6.
- Farber, J.M., Sanders, G.W. and Johnston, M.A. (1989). A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. **52**: 456-458.
- Farber, J.M., Coates, F. and Daley, E. (1992). Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **15**: 103-105.
- Farber, J.M., Ross, W.H. and Harwig, J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. Int. J. Food Microbiol. **30**: 145-156.
- Fatemi, P. and Frank, J.P. (1999). Inactivation of *Listeria monocytogenes*/Pseudomonas biofilms by peracid sanitizers. J. Food Prot. **62**: 761-5.
- Fenlon, D.R. (1985). Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. J. Appl. Bact. **59**: 537-543.
- Fenlon, D.R. (1986). Rapid quantitative assessment of the distribution of *Listeria* in silage implicated in a suspected outbreak of listeriosis in calves. Vet. Rec. **118**: 319-321.
- Fenlon, D.R. (1999). *Listeria monocytogenes* in the Natural Environment in *Listeria*, listeriosis and food safety, second Edition, Ed. Ryser, E. T., and Marth, E.H., M. Dekker. Inc. New York 2: 21-37.
- Fenlon, D.R., Stewart, T. and Donachie, W. (1995). The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. Lett. Appl. Microbiol. **20**: 57-60.
- Fenlon, D.R., Wilson, J. and Domachie, W. (1996). The incidence and level of *Listeria monocytogenes* contamination of food sources at primary production and initial processing. J. Appl. Bacteriol. **81**: 641-650.
- Fensterbank, R., Audurier, A., Godu, J., Guerrault, P. and Malo, N. (1984). Etude des souches de *listeria* isolées d'animaux malades et de l'ensilage consommé. Ann. Rech. Vét. **15**: 113-118.
- Flandrois, J.P. and Chomarar, M. (1998). Bactériologie médicale pratique. MEDSI/Mc Graw-Hill, Paris.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A., Broome, C.V. and Reingold, A.L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med. **3120**: 404-407.
- Forgeot, P., Truche, C., Staub, A. and Lamy, R. (1941). Premier cas de listériose animale observé en France. Bull. Acad. Vét. **5**: 195-197.
- Frances, N., Hornby, H. and Hunter, P.R. (1991). The isolation of *listeria* species from freshwater sites in Cheshire and North Wales. Epidemiol. Infect. **107**: 235-238.
- Frank, J.F. and Koffi, R.A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. J. Food Prot. **53**: 550-554.
- Franciosa, G., Pourshaban, M., Gianfranceschi, M. and Aureli, P. (1998). Genetic typing of human and food isolates of *Listeria monocytogenes* from episodes of listeriosis. Eur. J. Epidemiol. **14**: 205-210.
- Fthenakis, G.C, Saratsis, P., Tzora, A. and Linde, K. (1998). Naturally occurring subclinical ovine mastitis associated with *Listeria monocytogenes*. Sm. Rum. Research **31**: 23-27.
- Gaillard, J. L., Berche, P. and Sansonetti, P. (1986). Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **52**: 50-55.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. and Sansonetti, P. (1987). *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. Infect. Immun. **55**: 2822-2829.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Fréhel, C., Gouin, E. and Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigen from Gram-positive cocci. Cell **65**: 1127-1141.
- Gaillard, J.L., Gholizadeh, Y. and Pron, B. (1995). Diagnosis of human listeriosis: new approaches. Med. Mal. Infect. **25**: 251-256.
- Gaillard, J.L., Jaubert, F. and Berche, P. (1996). The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. J. Exp. Med. **183**: 359-369.
- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S. and Berche, P. (2000). The serine-pRotease ClpP is essential for the intracellular parasitism of the pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. (in press).
- Garcia-Gimeno, R.M., Zurera-Cosano, G. and Amaro-Lopez, M. (1996). Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetables salads in Spain. J. Food Saf. **16**: 75-86.

- Gay, M., Cerf, O. and Davey, K.R. (1996) Significance of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *L. monocytogenes* J. App. Bacteriol. **81**: 433-438.
- Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M. and Nunez, M. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in raw caprine milk. J. Dairy Sc. **79** (11): 1936-1941.
- Genigeorgis, C.A., Dutulesco, D. and Fernandez Garayzabal, J. (1989). Prevalence of *Listeria spp.* in Poultry Meat at the Supermarket and Slaughterhouse Level. J. Food Protect. **52** (9): 618-624.
- Genigeorgis, C.A., Oanca, P. and Dutulesco, D. (1990). Prevalence of *Listeria spp.* in Turkey Meat at the Supermarket and Slaughterhouse Level. J. Food Protect. **53** (4): 282-288.
- Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. and Berche, P. (1987). Purification, characterization and toxicity of sulfhydryl-activated hemolysin (listeriolysin O) from *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **55**: 1641-1646.
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J. L., Lecroisey, A., Alouf, J. E. and Berche, P. (1991). Purification and characterization of an extracellular 29-kDa phosphatidylcholine-phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. Infect. Immun. **59**: 2382-2388.
- George, S.M., Lund, B.M. and Brocklehurst, T.F. (1988). The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **6**: 153-156.
- Gérard, E. (1992). Contribution à l'étude de la contamination des porcs par certains microorganismes pathogènes : du début de l'engraissement à la fin de l'éviscération. Thèse pour le diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire, Faculté de médecine de Nantes.
- Geuenich, H.H. and Muller, H.E. (1984). Isolation and quantitative determination of *Listeria monocytogenes* in raw and biologically treated waste water. Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. B. **179**: 266-273.
- Ghenne, P., Fievez, L. and Granville, A. (1969). La listériose du chinchilla. Ann. Méd. Vét. **113**: 294-301.
- Giannati-Stefanou, A., Leontides, S., Psumas V. and Mauridist, T. (1997). Listeriosis : meningo encephalitis in 2 cattle in Greece. Bull. Hellenic Vet. Med. Soc. **48** (4): 188-197.
- Gill, C.O. and Jones, T. (1995). The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughtering plants. Food Microbiol. **12** : 135-141.
- Gill, D.A. (1931). Circling disease of sheep in New Zealand. Vet. J. **87**: 60.
- Gill, D.A. (1933). Circling disease : a meningoencephalitis of sheep in New-Zealand. Vet. J. **89**: 258-270.
- Giovannaci, I., Ragimbeau, C., Salvat, G., Vendevre, J.-L., Carlier, V. and Ermel, G. (1999). *Listeria monocytogenes* in pork slaughtering and cutting plants: Use of RAPD, PFGE and PCR-REA for tracing and molecular epidemiology. Int. J. Food Microbiol. **53**: 127-140.
- Giovannaci, I., Ermel, G., Salvat, G., Vendevre, J.-L. and Bellon-Fontaine, M.N. (2000). Physico-chemical surface properties of five *Listeria monocytogenes* strains from pork processing environment in relation with serotypes, genotypes and growth temperature. J. Appl. Microbiol. **88**: 992-1000.
- Gitter, M. (1976). *Listeria monocytogenes* in "oven-ready" poultry. Vet. Rec. **99** : 336-337.
- Gitter, M., Stebbings, R. StJ., Morris, J.A., Hannam, D. and Harris, C. (1986). Relationship between ovine listeriosis and silage feeding. Vet. Rec. **118**: 207-208.
- Gohil, V.S., Ahmed, M.A., Davies, R., and Robinson, R.K. (1995). Incidence of *Listeria spp.* in retail foods in the United Arab Emirates. J. Food Prot. **58** : 102-104.
- Goossens, P. L., Marchal, G. and Milon, G. (1992). Transfer of both protection and delayed-type hypersensitivity against live *Listeria* is mediated by the CD8+ T cell subset: a study with *Listeria*-specific T lymphocytes recovered from murine infected liver. Int. Immunol. **4**: 596.
- Goret, P. and Joubert, L. (1976). Epidémiologie pathogénique des listérioses chez les ruminants. Hypothèses de travail. Med. Mal. Infect. **6**: 21-28.
- Goret, P. and Oudar, J. (1965). Les listérioses animales. Fréquence et incidence éventuelle chez l'homme. Rev. Path. Comp. **2** : 602-626.
- Gouet, Ph., Labadie, J. and Serratore, C. (1978). Development of *Listeria monocytogenes* in monoxenic and polyxenic beef minces. Zentralblatt für Bakteriologie, parasitenkd Infektionskr Hyg. Erst Abt Orig. Reihe B hyg. Krakenhaushyg betriebshyg Praev Med. **166**: 87-94.
- Goulet, V. and Brohier, S. (1989). La listériose en France en 1986 : Recensement auprès de laboratoires hospitaliers. Path. Biol. **37**: 206-211.
- Goulet, V. Leonard, J.L. and Celers, J. (1986). Etude épidémiologique de la listériose humaine en France en 1984. Rev. Epidém. et Santé Publique **34**: 191-195.
- Goulet, V., Le Magny, F., Rebiere, I. and Espaze, E..P. (1989). La listériose en France en 1987 : Etude rétrospective à partir d'un échantillon d'hôpitaux publics. B.E.H. **12**: 45-46.

- Goulet, V., Mamet, J.P., Le Magny, F., Rebiere, I. and Espaze, E. (1990). La listériose en France en 1988 : Etude rétrospective à partir d'un échantillon d'hôpitaux publics. *B.E.H.* **33**:141-142.
- Goulet, V., Lepoutre, A., Rocourt, J., Courtieu, A.L., Dehaumont, P. and Veit, P. (1993). Epidémiologie de listériose en France. Bilan final et résultats de l'enquête épidémiologique. *Bull. Epidemiol. Hebdo.* **4**: 13-14.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebiere, I., Mouret, E., Lorente, C., Maillot E., Stainer, F. and Rocourt, J. (1995). Listeriosis from consumption of raw-milk cheeses. *The Lancet* **345**: 1581-1582.
- Goulet, V. and Marchetti, P. (1996). Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1992 : clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. *Scand. J. Infect. Dis.* **28**: 367-374.
- Goulet, V., Rocourt J., Stainer F. and Thomas, J-C. (1998a). Impact des mesures de contrôle mises en oeuvre depuis 10 ans sur l'incidence de la listériose en France. Deuxième Journée Scientifique du Réseau National de Santé Publique, St Maurice, décembre 1998.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moysse C., Dehaumont, P., Salvat, G., Veit, P. (1998b). Listeriosis outbreak associated with the consumption of rillettes in France in 1993. *J. Infect. Dis.* **177**(1): 155-160.
- Goyon, M. (1972). La listériose animale dans le département de la Sarthe. *Rec. Méd. Vet.* t. CXLVIII 949-958.
- Goyon, M. and Lecomte, S. (1957). Avortement à *Listeria monocytogenes* chez la vache. *Rec. Méd. Vét.* t. CXXXIII 647-654.
- Gracey, J. et al. (1999). Listeriosis. *Meat Hygiene, Infectious Diseases in W.B. Saunders*, 10^eed., 531-533.
- Graham, R. (1939). *Listerella* encephalitis or encephalomyelitis in domestic animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **95** : 289.
- Graham, R., Hesser, H. and Levine, N. (1940a). Listerellose du mouton et des bovidés. *The Cornell Veterinarian*. Janvier 1940 (Res. Rev. Med. Vet 1940.136).
- Graham, R., Hesser, H.R. and Levine, N.D. (1940b). Studies on *listerella*. II Field outbreaks of listerellosis in sheep and cattle. 97-111.
- Gras, M.-H., Druet-Michaud, C. and Cerf, O. (1994). La flore bactérienne des feuilles de salade fraîche. *Sci. Alim.* **14**: 173-188.
- Gravani, R. (1999). Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. M. Dekker Inc. Publisher, New-York, Ed. 2, pp. 657-709.
- Gray, M.L. (1958a). Listeriosis in animals in listeriosis symposium by Roots et coll. Beiheft. 1 zum Zentralblatt für veterinärmedizin. Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg.
- Gray, M.L. (1958b). Listeriosis in fowls a review. *Avian. Dis.* **2**: 296-314.
- Gray, M.L. (1960a). Isolation of *Listeria monocytogenes* from Oat silage. *Science* **132**: 1767-1768.
- Gray, M.L. (1960b). Silage feeding and listeriosis (a possible link in the relationship between). *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **1**: 205-208.
- Gray, M.L. and Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeria infections. *Bacteriol. Rev.* **30** (2): 309-371.
- Grimont, F. and Grimont, P.A.D. (1986). Ribosomal ribonucleic acid gene restrictions patterns as potential taxonomic tools. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiology* **137B**: 165-175.
- Grini, O. (1943). Listérellose du poulain. *Norsk. Vet. Tidskr.* 55-97 (Res. Rev. Med Vet. 1946 171).
- Gronstol, H. (1979). Listeriosis in sheep. Isolation of *Listeria monocytogenes* from grass silage. *Acta Vet. Scand.* **20**(4): 492-497.
- Gronstol, H. (1980). Listeriosis in sheep. *Listeria monocytogenes* in sheep fed hay or grass silage during pregnancy. Immunological state, white blood cells, total serum protein and serum iron. *Acta Vet. Scand.* **21**(1):1-10.
- Guzman, C., Rohde, M., Chakraborty, T., Domann, E., Hudel, M., Wehland, J. and Timmis, K. (1995). Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* **63**(9): 3665-3667.
- Hall, S.M., Pelerin, M., Soltanpoor, N. and Gilbert, R.J. (1995). A case control study of sporadic listeriosis in England and Wales. Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis. Perth Western, Australia, 2-6 October.
- Hamada, M., Kuroiwa, A., Matsumoto, T., Nomoto, K. and Takeya, K. (1981). Modification of protective mechanisms against *Listeria monocytogenes* during pregnancy. *J. Clin. Lab. Immunol.* **6**: 169-173.
- Hanawa, T., Yamamoto, T. and Kamiya, S. (1995). *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. *Infect. Immun.* **63**: 4595-4599.

- Hao, Y.Y., Brackett, R.E. and Doyle, M. P. (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.* **15**: 367-378.
- Hartford, T., O'Brien, S., Andrew, P.W., Jones, D. and Roberts, I.S. (1993). Utilization of transferrin-bound iron by *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 311-318.
- Harty, J. T. and Bevan, J. (1992). CD8⁺ T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*. *J. Exp. Med.* **175**: 1531-1538.
- Harvey, J. and Gilmour, A. (1994). Application of multilocus enzyme electrophoresis fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** : 1547-1553.
- Havell, E. A. (1986). Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **54**: 787-792.
- Heisick, J.E., Wagner, D.E., Nierman, M.L. and Peeler, J.T. (1989). *Listeria spp.* found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1925-1927.
- Helke, D.M., Somers, E.B. and Wong, A.C.L. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* to stainless steel and Buna-N in the presence of milk and individual milk components. *J. Food Protect.* **56**: 479-484.
- Helke, D.M. and Wong, A.C.L. (1994). Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. *J. Food Protect.* **57**: 963-968.
- Henson, S. (1995). Estimating the incidence of foodborne *Salmonella* and the effectiveness of alternative control measures. WHO consultation on preharvest foodborne disease control. Washington D.C., USA, 7-10 June 1995, 20 pages.
- Herman, L.M.F., De Block, J.H.G. and Moermans, R.J.B. (1995). Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 milliliters of raw milk by a two-step PCR with nested primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(2): 817-819.
- Hildebrandt, G., Beneke, B., Erol, I. and Müller, A. (1989). Hygienischer Status von Rohkostsalaten verschiedener Angebotsformen. *Arch. Lebensmittelhyg.* **40**: 49-72.
- Hirsbrunner, G., Nicolet, J., Tontis, A. and Martig, J. (1997). Cerebral listeriosis in cattle : review of the literature and retrospective analysis of 17 cows. *Tierärztliche Praxis* **25**: 336-343.
- Hitchins, A.D. (1996). Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **30**: 71-85.
- Hitchins, T. (1995). The epidemiological significance of the mean alimentary exposure to *Listeria monocytogenes* inferred from its foodborne occurrence and from consumption data. XII international symposium on problems of Listeriosis. Perth, Australia, Promaco Conventions Ltd, pp 357-363.
- Hof, H., Nichterlein, T. and Kretschmar, M. (1994). When are *Listeria* in foods a health risk ? *Trends Food Sci. Technol.* **5**: 185-190
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams S.T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hudson, J.A. and Mott, S.J. (1994). A survey for *Listeria* species motile aeromonias and *Yersinia enterocolitica* on bovine and ovine carcasses. *New Zeal. Vet. J.* **42** (1) : 33-34.
- Huhtanen, C.N., Jenkins, R.K. and Thayer, D.W. (1989). Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **9**: 610-613.
- Humbert, G., Duval, C., Fessard, C., Meunier, M. and Ledoux, A. (1976). Les listérioses en France. Résultats d'une enquête nationale (824 cas). *Méd. Mal. Infect.* **9bis**: 60-70.
- Husu, J.R. (1990). Epidemiological studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in the feces of dairy cattle. *J. Vet. Med.* **B37** : 276-282.
- ICMSF. (1994). Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* **22**: 89-96.
- Iida, T., Kanzani, M., Nakama, A., Kokubo, Y., Maruyama, T. and Kaneuchi, C. (1998). Detection of *Listeria monocytogenes* in Humans, Animals, and Foods. *J. Vet. Med. Sci.* **60**: 1341-1343.
- Inoue, S., Tanikawa, T., Kawaguchi, J., Iida, T. and Morita, C. (1992). Prevalence of *Listeria (spp)* in wild rats captured in the Kanto Area of Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **54** (3): 461-463.
- Jack, E.J. (1961). Septicémie à *Listeria monocytogenes* chez des veaux nouveaux nés. *Vét. Rec.* **73**: 846-847.
- Jackson, T.C., Acuff, G.R., Lucia, L.M., Prasai, R.K., Benner, R.A. and Terry, C.T. (1993). Survey of residential refrigerators for the presence of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* **56**: 874-875.

- Jacotot, H., Vallée, A. and Viirat, B. (1956). Une épizootie de listérellose dans un élevage de chinchillas. Bull. Acad. Vet. T. XXIX. 427-430.
- Jacquet, Ch., Rocourt, J. and Reynaud, A. (1993). Study of *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plant and characterization of the strains isolated. Int. J. Food. Microbiol. **20**: 13-22.
- Jacquet, Ch., Saint-Clément, C., Brouille, F., Catimel, B. and Rocourt, J. (1998). La listériose humaine en France en 1997 – Données du Centre National de référence des *Listeria*. Bull.Epidemiol. Hebdo. **33**:142-143.
- Jacquet, Ch., Brouille, F., Saint-Clément, C., Catimel, B. and Rocourt, J. (1999). La listériose humaine en France en 1998 - Données du Centre National de Référence des *Listeria*. Bull. Epidémiol. Hebdo. **37**: 153-154.
- Jensen, N.E., Aarestrup, F.M., Jensen, J. and Wegener, H. C. (1996). *Listeria monocytogenes* in bovine mastitis. Possible implication for human health. Int. J. Food Microb. **32**: 209-216.
- Jeong, D.K. and Franck, J.F. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. J. Food. Protect. **57**: 576-586
- Johnson, G.C., Maddox, C.W., Fales, W. H., Wolff, W.A., Randle, R.F., Ramos, J.A., Schwartz, H., Heise, K.M., Baetz, A.L., Wesley, I.V. and Wagner, D.E. (1996). Epidemiologic evaluation of encephalitic listeriosis in goats. J. Ann. Vet. Med. Ass. **208** (10): 1695-1699.
- Johnstone, A.D., (1990). Listeriosis of goats in New Zealand. Surveillance (Wellington) **17**-(1) : 11.
- Joncour, G. (1998). Episodes aigus d'uvéite : étude sur quatre troupeaux laitiers au cours du premier trimestre 1997, en Bretagne. Point. Vét. **29** (192): 433-440.
- Jones, D and Seeliger, H.P.R. (1995). *Listeria*. The prokaryotes, second edition. A handbook on the biology of bacteria : ecophysiology, isolation, identification, applications. A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.H. Schleifer (eds) ; Vol. II, Springer-Verlag.
- Jones, F.S. and Little, R.B. (1934). Sporadic encephalitis in cows. Arch. Path. **18** : 580.
- Juntilla, J.R., Niemelä, S.I. and Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. J. Appl. Bacteriol. **65**: 321-327.
- Kalmokoff, M.L., Daley, E., Austin, J.W. and Farber, J.M. (1999). Bacteriocin-like inhibitory activities among various species of *Listeria*. Int. J. Food Microbiol. **50**(5): 191-201.
- Kang, H.J., Son, W.G., Kang, G.S., and Park, C.E. (1991). Characteristics of isolates and incidence of *Listeria monocytogenes* in faeces from animals, feed and raw foods of animal origin. I Incidence of *Listeria monocytogenes* in raw milk, beef, chicken meat and animal faeces. Kor. J. of Vet. Public Health **15**(3) : 231-237.
- Kato, Y, Kohno, K., Toukubo, Y. Iida, T., Kanzaki, M., Ishibashi, M. and Kanenchi, C. (1994). *Listeria* carrier rats trapped in restaurants and food shops in buildings in central Tokyo. J. Jap. Vet. Med. Assoc. **47**: 349-352.
- Katsube, Y. and Maruyama, S. (1992). *Listeria monocytogenes* and listeriosis. Yamaguchi J. of Vet. Med. **19**(1) :24.
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A. and Berche, P. (1999). Listeriolysin O - dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes* : Upregulation of adhesion molecules, chemokines, and transcription factor NF- κ B. Mol. Microbiol. **31**: 709-722.
- Kerouanton, A., Brisabois, A., Denoyer, E., Dilasser, F., Grout, J., Salvat, G. and Picard, B. (1998). Comparison of five typing methods for the epidemiological study of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **18**: 61-71.
- Kerr, K.G., Birkenhead, D., Seale, K., Major, J. and Hawkey, P.M. (1993). Prevalence of *Listeria spp.* on the hands of food workers. J. Food Protect. **56** (6) : 525-527.
- Kerr, K.G., Kite, P., Heritage, J. and Hawkey, P.M. (1995). Typing of epidemiologically associated environmental and clinical strains of *L. monocytogenes* by Random Amplification of Polymorphic DNA. J. Food Prot. **58**: 609-613.
- Kittson, E. (1992). A case cluster of listeriosis in Western Australia with links to pate consumption. Eleventh International Symposium on Problems of Listeriosis. 11-14 May, abstr. 18.
- Ko, R., Smith, L.T. and Smith, G.M. (1994). Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. **176**: 426-431.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. and Cossart, P. (1992). *Listeria monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. Cell **68**: 521-531.
- Kroll, R.G., and Patchett, R.A. (1992). Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. **14**: 224-227.

- Krüger, W. (1963). Das vorkommen von *Listeria monocytogenes* in den verschiedenen Silagen und dessen ätiologische Bedeutung. Arch. exptl. Veterinaermed. **16**: 181-203.
- Krüll, M., Nöst, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T. and Suttorp, N. (1997). *Listeria monocytogenes* potently induces up-regulation of endothelial adhesion molecules and neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. J. Immunol. **159**(4): 1970-1976.
- Krysinski, E. P., Brown, L.J. and Marchisello, T.J. (1992). Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. J. Food Prot. **55**: 246-251.
- Kukharkova, L.L, Boyarshinov, P.K., Adutskevich, V.A. and Perova, P.B. (1960). Data on the hygienic judgement of meat in case of listeriosis. Veterinariya **37**: 74-79.
- Lainé, K. and Michard, J. (1988). Fréquence et abondance des *Listeria* dans des légumes frais découpés prêts à l'emploi. Microbiol. Alim. Nutr. **6**: 329-335.
- Larpen, J.P. (1999). Les *Listeria*. 2^{nde} édition Ed : Larpen J.P. Paris, Technique et documentation, Lavoisier.
- Larsen, H.E. (1964). Recherches sur l'épidémiologie de la listériose. Nordisk Veterinaer Medicin. **16**: 890-909. (Res. Rev. Méd. Vét. 1965, 638-639).
- Lavetter, A., Leedom, J. M., Mathies, A. W., Ivler, D. and Wehrle, P. F. (1971). Meningitis due to *Listeria monocytogenes*. A review of 25 cases. N. Engl. J. Med. **285**: 598-603.
- Lawrence, L.M. and Gilmour, A. (1994). Incidence of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. [published erratum appears in Appl Environ Microbiol 1995 Feb;61(2):847]. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 4600-4604.
- Lecoanet, J. (1973). Aspects actuels de la listériose des ruminants en France. Rec. Méd. Vét. **149**: 1283-1291.
- Lee, S.-H., Frank, J.F. (1991). Inactivation of surface-adherent *Listeria monocytogenes* hypochlorite and heat. J. Food Prot. **54**: 4-6.
- Leistner, L., Schmidt, U. and Kaya, M. (1989). Listerien bei Fleisch und fleischerzeugnissen. Mitteilungsblatt der Bundesanstalt für fleischforschung Kulmbach 28 Jahrgang, 192-199.
- Lemaire, V., Cerf, O. and Audurier, A. (1989) Thermal resistance of *L. monocytogenes*. Ann. Rech. Vét. **20**: 493-500.
- Lerliche V., Chassaing D. and Carpentier B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. Int. J. Food Microbiol. **51** : 169-182.
- Lerliche V and Carpentier B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* Biofilms. J. App. Microbiol. **88**: 594-605.
- Lerliche-Sibille, V. and Carpentier, B. (1999). Limitation de l'adhésion et de la croissance de *Listeria monocytogenes* sur de l'acier inoxydable par des biofilms de *Staphylococcus sciuri*. Colloque SFM: Les Micro-organismes des aliments: D'où viennent-ils ? Ont-ils changé ? Institut Pasteur de Paris, 14-15 Oct. 1999.
- Lesbouyries, G. (1943). Listériose du lapin. Rec. Méd. Vét. T. CXIX. **19**: 145-150.
- Lhopital, L. S., Marly, J., Pardon, P. and Berche, P. (1993). Kinetics of antibody production against listeriolysin O in sheep during listeriosis. J. Clin. Microbiol. **31**: 1537-1540.
- Lin, C.-M., Fernando, S.Y. and Wei, C.-I. (1996). Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 in vegetable salads. Food Control **7**: 135-140.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, M.L., Hayes, P., Weaver R., et al. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style-cheese. New Engl. J. Med. **319**: 823-828.
- Linton, R.H., Pierson, M.D., Bishop, J.R. (1990). Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heatshock. J. Food Protect. **53**: 924-927.
- Liu, G.Q, Sheng, W.W., Yang, M.Y., Lu, Y.L. and Zhang, Y.M. (1995). Diagnosis of *Listeria monocytogenes* infection in ducks. Chin. J. of Vet. Med. **21** (7) :24.
- Lleo, M.M., Tafi, M.C. and Canepari, P. (1998). Nonculturable Enterococcus faecalis cells are metabolically active and capable of resuming active growth. System. Appl. Microbiol. **21**: 333-339.
- Loessner, M.J., Rudolf, M. and Scherer, S. (1997). Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511:lucAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. Appl. Environ. Microbiol. **63**: 2961-2965.
- Loncarevic, S., Artursson, K. and Johansson, I. (1999). Case report. A case of canine cutaneous listeriosis. Vet. Dermat. **10**: 69-71.
- Loncarevic, S., Milanovic, A., Caklovica, F., Tham, W. and Danielsson-Tham, M.L. (1994a) Occurrence of *listeria* species in an abattoir for cattle and pigs in Bosnia and Hercegovina. Acta Vet. Scand. **35** (1): 11-15.

- Loncarevic, S., Tham, W. and Danielsson-Tham, M.L. (1994b). Occurrence of *Listeria* species in broilers pre and post-chilling in chlorinated water at two slaughterhouses. *Acta. Vet. Scand.* **35**: 149-154.
- Lopes, J.A. (1986) Evaluation of dairy and food plant sanitizers against *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* **69** :2791-2796.
- Lou, Y. and Yousef, A.E (1997). Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(4): 1252-1255.
- Lou, Y. and Yousef, A.E. (1999). Characteristics of *Listeria monocytogenes*. In : *Listeria, listeriosis and food safety*. Ryser E.T., Marth E.H. (eds). Second edition, Marcel Dekker Inc., N.Y., USA. 131-224.
- Lovett, J., Francis, D.W. and Hunt, J.M. (1987). *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Prot.* **50**: 188-192.
- Low, J.C. and Donachie, W. (1997). A review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet. J.* **153**: 19-29.
- Low, J.C. and Renton, C.P. (1985). Septicaemia, encephalitis and abortions in a housed flock of sheep caused by *listeria monocytogenes* type 1/2. *Vét. Rec.* **9**: 147-150.
- Low, J.C., Wright, F., McLauchlin, J. and Donachie, W. (1993). Serotyping and distribution of *listeria* isolates from cases of ovine listeriosis. *Vet. Rec.* **133** (7): 165-166.
- Low, J.C., Donachie, W., McLauchlin, J. and Wright, F. (1995). Characterization of *Listeria monocytogenes* strains from a farm environment. Proceedings of XII International Symposium on Problems of listeriosis. Perth. Western Australia. Publ. Promaco Conventions Pty: 141-144.
- Lucas, A. and Seeliger, H.P.R. (1957). Types sérologiques de quelques souches de *Listeria monocytogenes* rencontrées en France. *Rec. Méd. Vét. T. CXXXIII.* **7**: 373-378.
- Lucas, A., Bouley, G., Quinchon, C., Feugeas, C., Gourdon, J., Gourdon R. and Toucas, L. (1955). Etude sur la listériose et *Listeria monocytogenes* dans quelques espèces animales. *Rec. Méd. Vét. T. CXXXI.* **3**: 151-170.
- Lucas, A., Laroche, M., Hamel, J. and Chauvrat, J. (1962). L'infection naturelle à *Listeria monocytogenes* chez le canard, la perdrix, le faisan, le pigeon. *Rec. Méd. Vét. t. CXXXVIII* **1**: 31-38.
- Luft, B.J. and Remington, J.S. (1982). Effect of pregnancy on resistance to *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* infections in mice. *Infect. Immun.* **38**:1164-1171.
- Lukacs, K. and Kurlander, R. (1989). T cell-mediated protection against listeriosis: protection correlates with phagocyte depletion but not with INF-gamma production. *J. Immunol.* **1989**: 2879-2886.
- Lunden, J.M., Miettinen, M.K., Autio, T.J. and Korkeala, H.J. (1999). Enhanced adherence of house-flora *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel surface. In : Food microbiology and food safety into the next millenium . Proceeding of Food Micro 99, the 7th international conference of the international committee on food microbiology and hygiene (ICFMH). Veldhoven (NL), 13-17 September 1999. Ed. Tuijelaars A.C.J., Samson R.A., Rombouts F.M. and Notermans S. pp 803-804.
- Lyytikäinen, O., Ruutu, P.P., Mikkola, J., Siitonen, A., Maijala, R., Hatakka, M. and Autio, T. (1999). An outbreak of listeriosis due to *Listeria monocytogenes* serotype 3a from butter in Finland. *Eurosurveillance weekly*, 11 March 1999.
- Mackanness, G. B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* **116**: 381-406.
- Maisnier-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S.R. and Richard, J. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait* **72**: 249-263.
- Manzanno, M., Citterio, B., Maifreni, M. et al. (1995). Microbial and sensory quality of vegetables for soup packaged in different atmospheres. *J. Sci. Food Agric.* **67**: 521-529.
- Marchetti, Ph. (1996). Etude de 225 cas de listériose non materno-fœtale survenus en France en 1992 : Influence des conditions prédisposantes sur les manifestations cliniques et le pronostic de l'infection. Thèse pour le diplôme d'Etat de doctorat en médecine. Université de Nantes.
- Marron, L., Emerson, N., Gahan, C.G. and Hill, C. (1997). A mutant of *Listeria monocytogenes* LO28 unable to induce an acid tolerance response displays diminished virulence in a murine model. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4945-4947.
- Martin, S.A., Wallsten, T.S., and Beaulieu, N.D. (1995). Assessing the risk of microbial pathogens : application of a judgment-encoding methodology. *J. Food Protect.* **58** (3): 289-295.
- Maupas, Ph., Philippon, A., Audurier, A., Borderon, E. and Boulard, P. (1971). Epidémiologie et pathogénie des listérioses. *Sem. Hop. Paris* **47-43-44**: 2475-2480.
- Maupas, Ph., Chiron, J.P. and Bind, J.L. (1976). Nouveaux aspects épidémiologiques et pathogéniques de la listériose. *Méd. Mal. Inf.* **6-5**: 172-179.

- McCracken, G. H. and Bishara, J. F. (1990). Perinatal bacterial diseases, p. 940-966. In: J. S. Remington and J. O. Klein (Ed.), *Infectious diseases of the foetus and newborn*, Saunders Co, Philadelphia.
- McDonald, F. and Sutherland, A.D. (1994). Important differences between generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two enrichment broths. *J. Dairy Res.* **61**: 433-436.
- McGowan, A.P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P.M. and Reeves, D.S. (1994). The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria spp.* in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* **21**: 325-334.
- McLauchlin, J. (1987). *Listeria monocytogenes* advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* **63**: 1-11.
- McLauchlin, J. (1995). What is the infective dose for human Listeriosis. Proceedings of the XII international symposium on problems of Listeriosis. Perth, Western Australia, 2-6 October 1995, 365-370.
- McLauchlin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* **7** (4-5) : 187-193..
- McLauchlin, J. and Gilbert, R.J. (1990). *Listeria* in food. *PHLS Microbiol. Dig.* **7**: 54-55.
- McLauchlin, J. and Low, J.C. (1994). Primary cutaneous listeriosis in adults : an occupational disease of veterinarians and farmers. *Vet. Rec.* **135**: 615-617.
- McLauchlin, J. Hall, S.M., Velani, S.K. and Gilbert, R.J. (1991). Human listeriosis and pate: a possible association. *Brit. Med. J.* **303**: 773-775.
- Mead, P. (1999). Multisite outbreak of listeriosis traced to processed meats, August 1998- March 1999, Center fo Disease Control and Prevention, Atlanta, USA, pp. 1117-1118.
- Menard, J.L., Sanaa, M. and Serieys, F. (1992). Contamination du lait par *Listeria monocytogenes* à la ferme : étude des facteurs de risque, part des origines intramammaires et extramammaires. Journée « *Listeria* » Arilait et Institut de l'Élevage, Carré des sciences, Paris, France, 20 Octobre 1992, 9-18.
- Menard, J.L. and Sanaa, M. (1994). Origine et prévention de la contamination du lait cru par *Listeria monocytogenes*. *Renc. Rech. Ruminants ITEB* 265-268.
- Mengaud, J., Geoffroy, C. and Cossart, P. (1991). Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence : its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* **59**: 1043-1049.
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vazquez-Boland, J.A., Milon, G. and Cossart, P. (1996). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene which is autoregulated. *Mol. Microbiol.* **5**: 2273-2283.
- Michard, J., Jardy, N. and Gey, J.L. (1993). Bactériologie des pousses de « soja » (*Vigna radiata*). *Microbiol. Alim. Nutr.* **11**: 135-146.
- Mielke, M. E. A., Ehlers, S. and Hahn, H. (1988). T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection, and granuloma formation in primary and secondary *Listeria* infection in mice: superior role of Lyt-2+ cells in acquired immunity. *Infect. Immun.* **56**: 1920.
- Miettinen, M.K., Bjorkroth, K.J. and Korkeala, H.J. (1999). Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Food Microbiol.* **18**: 187-192.
- Miller, A. J. (1992). Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **55**(6): 414-418.
- Miller, A.J., Whiting, R.C. and Smith, J.L. (1997). Use of risk assessment to reduce listeriosis incidence. *Food Technol.* **51**(4): 100-103.
- Molello, J.A. and Jensen, R. (1964). Placental Pathology IV. Placental Lesions of Sheep. Experimentally Infected with *Listeria monocytogenes*. *Ann. J. Vet. Res.* **25**: 441-449.
- Moll, G.N., Konings, W.N. and Driessen, A.J.M. (1999). Bacteriocins: Mechanisms of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek* **76**: 185-198.
- Monk, J.D., Clavero, M.R.S., Beuchat, L.R., Doyle, M.P. and Brackett, R.E. (1994). Irradiation inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in low- and high-fat, frozen and refrigerated ground beef. *J. Food Prot.* **57**: 969-974.
- Morailon, P. and Yalcin, N. (1967). Contribution à l'étude de la listériose ovine et de l'immunoprophylaxie antilisterienne en France. *Rec. Med. Vet. T. CXLIII.* 767-775.
- Mounier, J., Ryter, A., Coquis-Rondon, M. and Sansonetti, P. J. (1990). Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **58**: 1048-1058.
- Mouton, R.P. and Kampelmacher, E.H. (1966). Proceedings of the third International symposium on Listeriosis. Bilthoven. 425-434.

- Murray, E.G.D., Webb, R.A. and Swann, M.B.R. (1926). A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (*n.sp.*). J. Pathol. Bacteriol. **29**: 407-439.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (1995). Manual of Clinical Microbiology, 6th edition. ASM Press, Washington.
- Naerlana, G. (1950). Om listerellose hos smafe (san og geit). Nord. Vet. Med. **2**: 1-18.
- Nagi, M.S. and Verma, J.D. (1967). An outbreak of listeriosis in chickens. Ind. J. Vet. Med. **44**: 549-553.
- Nair, S., Derré, I., Msadek, T., Gaillot, O. and Berche, P. (2000). CtsR is a repressor of the class III heat shock genes in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. *in press*.
- Nguyen-The, C. and Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **34** (4): 371-401.
- Nguyen-The, C. and Carlin, F. (2000). Fresh and Processed vegetables. In: The microbiological safety of foods, B.M. Lund, A.C. Baird-Parker, G.W. Gould (eds), Aspen Publisher Inc., Gaithersburg MD.
- Nguyen-The, C. and Lund, B.M. (1991). The lethal effect of carrot on *Listeria* species. J. Appl. Bacteriol. **70**(6): 479-488.
- Nicolas, J.A. (1983). Rôle de la consommation d'ensilage dans la listériose ovine. Microbiol. Alim. Nutr. **1**: 71-76.
- Nicolas, J.A. and Vidaud, N. (1987). Contribution à l'étude des *Listeria* présentes dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine. Rec. Méd. Vét. **163** (3): 283-285.
- Nicolas, J.A., Pestre-Alexandre, M., Kirmaier, S. and Taillandier, F. (1972). Contribution à l'étude de la listériose. La listériose, maladie alimentaire. Relation entre l'alimentation par ensilage et la listériose ovine. Rev. Méd. Vét. **123**: 61.
- Nicolas, J.A., Pestre-Alexandre, M., Fargeot, C., Chauchef, S. and Lautie, R. (1974). Enquête épidémiologique de la listériose des ovins et des caprins. Rev. Méd. Vét. **125**: 1369-1378.
- Nicolas, J.A., Espaze, E.P., Rocourt, J., Cornuejols, M.J., Lamachere, M., Vidaud, N., Catimel, B. and Courtieu, A.L. (1988). Listériose animale et ensilage. Intérêt de la sérotypie et de la lysotypie dans l'approche épidémiologique. Rec. Méd. Vét. **164** (3): 203-206.
- Nilsson, A. and Karlsson, K.A. (1959). *Listeria monocytogenes* isolations from animals in Sweden during 1948 to 1957. Nord. Vet. Med. **11**: 305-315.
- Nieman, R. E. and Lorber, B. (1980). Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. Rev. Infect. Dis. **2**: 207-227.
- Nolan, D.A., Chamblin, D.C. and Troller, J.A. (1992). Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Int. J. Food Microbiol. **16**: 323-335.
- North, R. J. (1970). The relative importance of blood monocytes and fixed macrophages to the expression of cell-mediated immunity to infections. J. Exp. Med. **132**: 521-534.
- Norton, D.M. and Batt, C.A. (1999). Detection of Viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. Appl. Environ. Microbiol. **65**: 2122-2127.
- Notermans, S. Dufrenne, J. Teunis, P. and Chackraborty, T. (1998). Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. J. Food Protect. **61**(2): 244-248.
- O'Driscoll, B., Gahan, C.G. and Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 1693-1698.
- Ogata, S. A. and Beaman, B. L. (1992). Adherence of *Nocardia asteroides* within the murine brain. Infect. Immun. **60**: 1800-1805.
- Oh, D. and Marshall, D.L. (1994). Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids. J. Food Sci. **59**: 1258-1261.
- Okimasa, A., Tetsuya, H. and Yutaka, A. (1957). Studies on the mechanism of infection of the brain with *Listeria monocytogenes*. Ann. J. Vet. Res. **1**: 147-157.
- Olson, C. and Segre, D. (1956). An agent enhancing listeriosis of sheep. Ann J. Vet. Res. **4** : 235-242.
- Olson, C., Bagdonas, V., Rollins, C.L. and Blore, I.C. (1953). The relation of silage to listeriosis in sheep. Am. J. Vet. Res. **3**: 202-208.
- Olson, C., Grace, O.D., Segre and D., Blore, C. (1957). Exacerbation du pouvoir pathogène de la *Listeria* chez le mouton par du matériel virulent provenant de bovins à «mucosal disease». Am. J. Vet. Res. **18**: 303, 309. (Res. Rev. Med. Vet. 1958, 314).

- Orth, R. and Mrozek, H. (1989). Is the control of *Listeria Campylobacter*, and *Yersinia* a disinfection problem ? *Fleischwirtschaft* **69** :1575-1576.
- Osebold, J. W. and Inouye, T. (1954a). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural hosts. I. Rabbit studies. *J. Infect. Dis.* **95**: 52-66.
- Osebold, J. W. and Inouye, T. (1954b). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infections in natural hosts. II. Sheep studies. *J. Infect. Dis.* **95**: 67-78.
- Osebold, J.W., Kendrick, J.W. and Njokes-Obi, A. (1960a). Avortement chez la vache et infection naturelle à *Listeria monocytogenes*. *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **137**: 221-226.
- Osebold, J.W., Kendrick, J.W. and Njokes-Obi, A. (1960b). Avortements chez la vache provoqués expérimentalement par *listeria monocytogenes*. *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **137**: 227-233.
- Osterholm, M.T. and Potter, M.E. (1997). Irradiation pasteurisation of solid foods : taking food safety to the next level. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 575-577.
- Owen, C.R., Meis, A., Jackson, J.W. and Stoenner, H.G. (1960). A case of primary cutaneous listeriosis. *N. Engl. J. Med.* **262**: 1026-1028.
- Pagan, R., Condon, S. and Sala, F.J. (1997). Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3225-3232.
- Pallaske, G. (1941). Listériose de la poule en Allemagne. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **441** (Res. Rev. Med. Vet. 1944, 138).
- Palumbo, S.A. and Williams, A.C. (1991). Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiol.* **8** : 63-68.
- Pamer, E. G., Harty, J. T. and Bevan, M. J. (1991). Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **353**: 852-855.
- Pandit V.A. and Shelef L.A. (1994). Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) *Food Microbiol.* **11**: 57-63.
- Papiernik, P., Lucidarme, P., Pons, J.-C. (1995). Feto-maternal listeriosis in a teaching hospital maternity on 25000 births from 1980 to 1990. *Med. Mal. Infect.* **25**: 233-237.
- Pardon, P., Cerf, O. and Lahellec, C. (1994). *Salmonella*, *listeria* and food hygiene. Scientific report of a collaborative research program. (1991-1993). *Vet. Res.* **25**: 410-422.
- Park, S.F. and Kroll, R.G. (1993). Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **8**: 653-661.
- Paterson, J.S. (1937). Infection de la poule par une *Listerella*. *Vet. Rec.* **49**: 1533.
- Payne, K.D., Rico-Munoz, E. and Davidson, P.M. (1989). The antimicrobial activity of phenolic compounds against *Listeria monocytogenes* and their effectiveness in a model milk system. *J. Food Protect.* **52**(3): 151-153.
- Pearson, L.-J. and Marth, E.H. (1990). *Listeria monocytogenes*-threat to a safe supply : a review. *J. Dairy Sci.* **73**(4): 912-928.
- Peelers, J.T. and Bunning, V.K. (1994). Hazard assessment of *Listeria monocytogenes* in the processing of bovine milk. *J. Food Protect.* **57**: 689-697.
- Peixoto, P.V. (1995). Considerações sobre a forma cerebral da listeriose. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* **15**: 125-126.
- Peters, M. and Born-Stapp, P. (1997). *Listeria monocytogenes*. Infektion in einer Ziervogelvoliere. *Kleintierpraxis* **42** (8): 597-682.
- Petran, R.L. and Swanson, K.M.L. (1993). Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Protect.* **56**: 616-618.
- Petran, R.L. and Zottola, E.A. (1989). A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.* **54** : 458-460.
- Phan-Thanh, L. and Gormon, T. A. (1997). Chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *Int. J. Food Microbiol.* **35**: 91-95.
- Phan-Thanh, L. and Montagne, A. (1998). Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**: 183-191.
- Pierre, O. and Veit, P. (1996). Plan de surveillance de la contamination par *Listeria monocytogenes* des aliments distribués. *Bull. Epidemiol. Hebd.* **45**: 195-197.

- Piffaretti, J.C., Kressbuch, H., Aeschbacher, M., Bille, J., Bannerman, E., Musser, J.M., Selander, R.K. and Recourt, J. (1989). Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**:3818-3822.
- Pine, L., S. Kathariou, F. Quinn, V. George, J. D. Wenger and R. E. Weaver (1991). Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. J. Clin. Microbiol. **29**: 990-6.
- Pinède, L., Manquat, G., Barnoud, D., Croizé, J., Guignier, M., Stahl, J.P. and Micoud, M. (1993). Listériose neuroméningée de l'adulte. Aspects cliniques et apport du cotrimoxazole en monothérapie. Presse Med. **22**: 1385-1390.
- Pini, P.N. and Gilbert, R.J. (1988). The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. **6**: 317-326.
- Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Reeves, M., Broome, C.V. and Wenger, J.D. (1992). The role of foods in sporadic listeriosis: II. Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA **267**: 2046-2050.
- Plagemann, O. and Weber, A. (1988). *Listeria monocytogenes* als Abortursache bei Klippscheifern (*Procapra capensis*). Kleintierpraxis **33**: 317-318.
- Potel, J. (1953). Ätiologie der *Granulomatosis infantiseptica*. Wissenschaftl Z. Martin Luther Univ. **54**: 341-364.
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I. and Berche, P. (1993). The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for the maturation of the phosphatidyl choline-phospholipase C : direct evidence by gene complementation. Infect. Immun. **61**: 1576-1580.
- Premaratne, R.J., Wei-Jen, L. and Johnson, E.A. (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 3046-3048.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. and Gaillard, J.L. (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infect. Immun. **66**: 747-755.
- Qu, B., Su, J. and Hou, K. (1996). Diagnosis and treatment of suspected listeriosis in buffaloes. Chim. J. of Vet. Med. **22**(10) 21.
- Racz, P., Tenner, K. and Mero, E. (1972). Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. Lab. Invest. **26**: 694-700.
- Radas A., Ermel G., Gerault P. Salvat G. and Colin P. (1999). Evaluation du risque posé par *Listeria monocytogenes* dans les abattoirs de volailles. Communication orale : Colloque SFM : « Les micro-organismes des aliments : D'où viennent-ils ? Ont-ils changés ? » 14-15 Octobre 1999. Institut Pasteur Paris, France.
- Rasch, M. and Knochel, S. (1998). Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. Lett. Appl. Microbiol. **27**:275-8.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A. and Ball, A. (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. Bacteriol. **149**: 1-5.
- Ratkowsky, D.A., Lowry, R.K., McMeekin, T.A., Stokes, A.N. and Chandler, R.E. (1983). Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. J. Bacteriol. **154**: 1222-1226.
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J. L., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. and Berche, P. (1992). Reduced virulence of *Listeria monocytogenes* in phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. Infect. Immun. **60**: 916-921.
- Ravier, J.F. (2000) (Communication personnelle).
- Redline, R.W. and Lu, C.Y. (1987). Role of local immuno-suppression in murine foetaplacental listeriosis. J. Clin. Invest. **79**: 1234-1241.
- Richard, J. (1996). Utilisation de bactériocines pour la production d'aliments plus sûrs: Mythe ou réalité ? Lait **76**: 179-189.
- Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca M.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D. and Broome, C.V. (1994). A point-source foodborne Listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J. Infect. Dis. **170**: 693-696.
- Rocourt, J. and Jacquet, C. (1993). Centre National de Référence pour la lysotypie et le typage moléculaire des *Listeria* : rapport pour l'année 1992, Institut Pasteur, Paris, pp. 68.
- Rocourt, J. and Jacquet, C. (2000). *Listeria* et listériose. In: Précis de bactériologie clinique, Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. (eds). Editions Eska 2000, pp. 943-956.
- Rocourt, J. and Seeliger, H.P.R. (1985). Distribution des espèces du genre *Listeria*. Zentral Bakteriell. Mikrobiol. Hyg. A. **259**: 317-330.

- Rocourt, J., Audurier, A., Courtieu, A.L., Durst, J., Ortel, A., Schrettenbrunner, A. and Taylor, A.G. (1985). A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie. Hygiene. Ser. A **259**: 489-497.
- Rocourt, J., Jacquet, C. and Bille, J. (1997). Human listeriosis - 1991/1992. WHO/FNU/FOS/97.1, World Health Organization, Geneva (Switzerland).
- Rocourt, J., Jacquet, C. and Reilly, A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafood. Int. J. Food Microbiology. Sous presse.
- Rodriguez, J.L., Gaya, D., Hedina, M. and Nunez, N. (1994). Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in ewe's raw milk. J. Food Prot. **57**: 521-575.
- Roots, E. and Strauch, D. (1958). Listeriosen symposium. Beiheft. 1 zum Zentralblatt für veterinärmedizin. Verlag Paul Parey in Berlin und Hamburg.
- Rorvik, L.M., Caugant, D.A. and Yndestad, M. (1995). Contamination pattern of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp in salmon slaughterhouse and smoked salmon processing plant. Int. J. Food Microbiology. **25**: 19-27.
- Rosen, H., Gordon, S. and North, R.J. (1989). Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells. J. Exp. Med. **170**: 27-37.
- Ross, R. P., Galvin, M., Mc Auliffe, O., Morgan, S.M., Ryan, M.P., Twomey, D.P., Meaney, W.J. and Hill, C. (1999). Developing actions for lactococcal bacteriocins. Antonie van Leeuwenhoek **76**: 337-346.
- Rosso, L. (1995). Modélisation et microbiologie prévisionnelle. Elaboration d'un nouvel outil pour l'agroalimentaire. Thèse de Doctorat, Université Lyon 1.
- Rosso, L., Lobry, J.R. and Flandrois, J.P. (1993). An unexpected correlation between cardinal temperatures of microbial growth highlighted by a new model. J. Theor. Biol. **162**: 447-463.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S. and Flandrois, J.P. (1995). Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. Appl. Environ. Microbiology. **61**: 610-616.
- Rosso, L., Bajard, S., Flandrois, J.P., Lahellec, C., Fournaud, J. and Veit, P. (1996). Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: consequences for the shelf life of chilled products. J. Food Prot. **59**: 944-949.
- Rosso, L., Zuber, E., Pichat, C. and Flandrois, J.P. (1997). Simple relationship between acid dissociation constant and minimal pH for microbial growth in laboratory medium. Int. J. Food Microbiology. **35**: 75-81.
- Rouquette, C., Tascon, R., Pellegrini, E., Bolla, J. M., Ripio, M. T., Vazquez-Boland, J. A. and Berche, P. (1996). Identification of a ClpC ATPase required for stress tolerance and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiology. **21**: 977-988.
- Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S. and Berche, P. (1998). The ClpC ATPase is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. Mol. Microbiology. **27**: 1235-1245.
- Rouse, R.J. (1999). Manual of equine practice. 2^o ed. Clinical Bacteriology. p. 643.
- Ryser, E.T. (1999). Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In: *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser E.T., Marth E.H. (eds). Second edition, Marcel Dekker Inc., N.Y., USA: 359-409.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. J. Food Protect. **50**: 372-378.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. (1999). *Listeria*, listeriosis and food safety. Ryser E.T., Marth E.H. (eds). Second edition, Marcel Dekker Inc., N.Y., USA.
- Ryser, E.T., Arimi, S.M. and Donnelly, C.W.W. (1997). Effects of pH on distribution of *Listeria* ribotypes in corn, hay, and grass silage. Appl. Environ. Microbiology. **63**: 3695-3697.
- Salamina G., Dalle Donne E., Niccolini A., Poda G., Cesaroni D., Bucci M., Fini R., Maldini M., Schuchat A., Swaminathan B., Bibb W., Rocourt J., Binkin N. and Salmaso S. (1996). A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. **117** (3): 429-436.
- Salvat, G., Toquin, M.T., Michel, Y. and Colin, P. (1995). Control of *Listeria monocytogenes* in the delicatessen industries: the lessons of a listeriosis outbreak in France. Int. J. Food Microbiology. **25**: 75-81.
- Sammarco, M.L., Ripabelli, G., Ruberto, A. Iannitto, G., and Grasso, G.M. (1997). Prevalence of *Salmonellae*, *Listeriae*, and *Yersiniae* in the slaughterhouse environment and on work surfaces, equipment and workers. J. Food Protect. **60** (4) : 367-371.

- Sampathkumar, B., I. Xavier, J., Yu, L. S. and Khachatourians, G. G. (1999). Production of listeriolysin O by *Listeria monocytogenes* (Scott A) under heat-shock. *Int. J. Food Microbiol.* **48**: 131-137.
- Sanaa, M. (1993). Epidemiologie de la contamination du lait à la ferme par *Listeria monocytogenes*. Synthèse des principaux résultats. *Epidémiol. Santé Anim.* **24**: 155-169.
- Sanaa, M. (1994). Listériose et contamination du lait et des produits dérivés du lait. *Point Vet.* **26**: 69-78.
- Sanaa, M. and Menard, J.L. (1994). Contamination du lait cru par *Listeria monocytogenes* : origines, facteurs de risque, prévention. *Rec. Méd. Vet.* **43**: 437-432.
- Sanaa, M., Poutrel, B., Menard, J.L. and Sericys, F. (1993). Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* **76**: 2891-2898.
- Saurat, P., Lautié, R. and Lescure, F. (1959). Un nouveau foyer de listériose ovine. Traitement par le chloramphénicol en association avec les sulfamides. *Rev. Med. Vet. T. CX* : 593-598.
- Schaak, M.M. and Marth, E.H. (1988). Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. *J. Food Protect.* **51**: 848-852.
- Schelcher, F. and Sanaa, M. (1993). Prophylaxie des infections à *Listeria monocytogenes* chez les êtres vivants. *Epidémiol. santé anim.* **24**: 33-40.
- Schillinger, U., Chung, H.S., Keppler, K., Holzapfel, W.H. (1998). Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 657-63.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S. and Broome, C.V. (1983). Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* **308**: 203-206.
- Schlech W.F., Chase D.P. and Badley A. (1993). A model of food-borne *Listeria monocytogenes* infection in Sprague-Dawley rat using gastric inoculation: development and effect of gastric acidity on infective dose. *Int. J. Food Microbiol.* **18**: 15-24.
- Schlegel-Oprecht, E. (1955). Un cas de listériose chez le porc. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **97**: 542-547. (Res. Rev. Med. Vet. 1956 – 794).
- Schroeder, H. and Van Rensburg, I.B.J. (1993). Generalised *Listeria monocytogenes* infection in a dog. *J. of S. Afr. Vet. Ass.* **64** (3): 133-136.
- Schuchat, A., Deaver, K., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Mascola, L., Pinner, R.W., Reingold, A.L., Broome, C. and the Listeria Study Group (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. *JAMA* **267**(15): 2041-2045.
- Schwartz, B., Broome, C.V., Brown, G.R., Hightower, A.W., Ciesielski, C.A., Gaventa, S., Gellin, B.G., Mascola, L. and the Listeriosis Study Group. (1988). Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* **2**: 779-782.
- Schwartzbrod, J., Papadopoulos, O. and Burdin, J.C. (1989). Detection et comportement des *Listeria* dans les boues d'épuration. *Microbiol. Alim. Nutr.* **7**: 225-232.
- Scotter, S. (1999a). Detection of *L. monocytogenes* according to EN ISO 11290-1-EU project SMT4-CT96-2098, Final report- Febuary (1999). CSL. York -UK.
- Scotter, S. (1999b). Enumeration of *L. monocytogenes* according to EN ISO 19290-2-EU project SMT4-CT96-2098, Final report- March (1999). CSL. York -UK.
- Seeliger, H.P.R. (1961). *Listeriosis New-York* : Hafner Publishing.
- Seeliger, H.P.R. (1971). Les rapports entre la listériose chez l'homme et l'animal. *Ann. Méd. Vét.* **2 115**: 73-86.
- Seeliger, H.P.R. and Höhne, K. (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth. Microbiol.* **13**: 31-49.
- Seeliger, H.P.R. and Jones D. (1986). *Genus Listeria Pirie* 1940, 383^{AL}. In : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.H. Holt (eds), Williams & Wilkins, Baltimore, vol. 2, pp. 1235-1245.
- Seeliger, H.P.R., Linzenmeier, G. (1955). Etude sérologique des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France. *Ann. Inst. Post.* **88**: 127-128.
- Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P., Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria spp.* In : domestic, retail, and industrial refrigerators in Greece. *Int. J. Food Microbiol.* **34**(2): 171-177.
- Sibeliuss, U., Schulz, E.C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W. and Grimminger, F. (1999). Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infect. Immun.* **67**: 1125-30.

- Siddique, I.H., McKenzie, B.E., Sapp, W.J. and Rich, P. (1978). Light and electronmicroscopic study of the livers of pregnant mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Am. J. Ret. Res.* **39**: 887-892.
- Sielaff, H. von (1968). Die lebensmittelhygienische Bedeutung der Listeriose. *Monatsch. Veterinärmed.* **21**: 750-758.
- Signoretto, C., Lleo, M.M., Tafi, M.C. and Canepari P. (2000). Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1953-1959.
- Simon, N., Coulanges, V., Andre, Ph. and Vidon, D.J-M. (1995). Utilization of exogenous siderophores and natural catechols by *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1643-1645.
- Siragusa, G.R. and Johnson, M.G. (1989). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system. *Appl Environ Microbiol.* **55**: 2802-2805.
- Siswanto, H.P., Gratadoux, J. and Richard, J. (1996). Potentiel inhibiteur de la souche de *Brevibacterium linens* productrice de la linenscine OC2 vis-à-vis de *Listeria* et de *Staphylococcus aureus*. *Le lait.* **76**: 501-542
- Sizmur, K. and Walker, C.W. (1988). *Listeria* in prepacked salads. *Lancet* **i** :1167.
- Skovgaard, N. (1990). The impact of the prevalence of *Listeria monocytogenes* in the environment on meat and milk hygiene. *Microbiol. Aliments Nutrition* **8**: 15-20.
- Skovgaard, N. and Morgen, C.A. (1988). Detection of *Listeria spp.* in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* **6** : 229-242.
- Skovgaard, N. and Norrung, B. (1989). The incidence of *Listeria spp.* in faeces of Danish pigs and in minced prok meat. *Int. J. Food Microbiol.* **8** : 59-63.
- Slivko, V.V. (1965). La Listeriose. *Bull. Off. Int. Epiz.* **64**: 765-777.
- Slutsker, L. and Schuchat, A. (1999). In : *Listeria, Listeriosis and Food Listeriosis*. Ryser E. and Marth E. (Eds), Marcel Dekker, Inc New York-Basel:75-95.
- Smith, H.C. and Sundquist, I. (1960). Listériose dans un troupeau de bovins. *Vet. Med.* **55**: 70-73.
- Smoot, L.M. and Pierson, M.D. (1998a). Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *J. Food Prot.* **61**: 1293-8.
- Smoot, L.M. and Pierson, M.D. (1998b). Influence of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *J. of Food Prot.*, **61**, 1293-1298.
- Somers, E.B., Schoemi, J.L. and Wong, A.C.L. (1994). Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **22**: 269-276.
- Song, H.J. and Richard, J. (1997). Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 155-161.
- Sörqvist, S. (1993). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* by two recovery media used with and without cold pre-incubation. *J. Appl. Bacteriol.* **74**: 428-432.
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C. and Hatfield, J.R. (1989). Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* **52**: 571-573.
- Spencer, G. R., Hayt, H. H. and Whitehair, C.K. (1945). Listerellose du mouton. *Biological abstracts* **19**: 380 (Res. Rev. Med. Vet. 1945. 278).
- Spitzer, P. G., Hammer, S. M. and Karchmer, W. (1986). Treatment of *L. monocytogenes* infection with trimethoprim-sulfamethoxazole : case report and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 427-430.
- Stahl, V., Garcia, E., Hezard, B. and Fassel, C. (1996). Maîtrise de la contamination par *Listeria monocytogenes* dans les exploitations laitières et l'industrie fromagère. *Path. Biol.* **44** (9): 816-824.
- Stanczak, B.J. and Szczawinski, J. (1996). Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in milk and cream with different fat contents. *Med. Vet.* **52** (6): 389-391.
- Staples, P. (1997). Listerials infections of animals and birds in New Zealand. *Surveillance (Wellington).* **24** (4) : 12-13.
- Steingruegge, E.G., Maxcy, R.B. and Liewen, M.B. (1988). Fate of *Listeria monocytogenes* on ready-to-serve lettuce. *J. Food Prot.* **51**: 596-599.
- Stelma, G. N., Jr., A. L. Reyes, J. T. Peeler, D. W. Francis, J. M. Hunt, P. L. Spaulding, C. H. Johnson and J. Lovett (1987). Pathogenicity test for *Listeria monocytogenes* using immunocompromised mice. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 2085-9.
- Stephens, J.C, Roberts, I.S., Jones, D.and Andrew, P.W. (1991). Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. *J. Appl. Bacteriol.* **70**: 239-244.

- Struillou, L. and Raffi, F. (1997). Listérioses. Encyl. Méd. Chir. (Elsevier, Paris). Maladies Infectieuses, 8-017-R-10, Thérapeutique, 25-039-A-10, pp.7
- Stuart-Paterson, J. (1937). *Listerella* infection in fowls. Vet. Rec. **49**: 1533-1534.
- Sturgess C.P. (1989). Listerial abortion in the bitch. Vet. Rec., **124**: 177-187.
- Sutherland, P. and Porritt, R. (1995). Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australian dairy factory environments. In: proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis, Perth, Western, Australia, 2-6 October 1995, 291-297.
- Sutherland, P. and Porritt, R. (1996). Dissemination and ecology of *Listeria monocytogenes* in Australian dairy factory environments. Food Australia **48**: 172-178.
- Sword, C.P. (1966). Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection. Influence of iron. J. Bacteriol. **92**: 536-542.
- Tabouret, M., J. De Rycke, A. Audurier and B. Poutrel (1991). Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. J. Med. Microbiol. **34**: 13-8.
- Tappero, J.W., Schuchat, A., Deaver, K.A., Mascola, L. and Wenger, J.D. (1995). Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: Effectiveness of prevention efforts. J. Amer. Med. Assoc. **273**: 1118-1122.
- Thibault, P., Despierre, M., Joubert, L., Oudar, J., Hugon, R. and Arnal, W. (1963). Listériose de la truite d'élevage (*Salmo iridens*). Rev. Méd. Vét. T. CXIV. **7**: 517-522.
- Tilney, L.G., Connelly, P.S. and Portnoy, D.A. (1990). Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. J. Cell Biol. **111**: 2979-2988.
- Tiwari, N.P. and Aldenrath, S.G. (1990). Occurrence of *Listeria* Species in food and environmental samples in Alberta. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. **23**: 109-113.
- Toquin, M.T. and Colin, P. (1994). Prévalence des *Listeria* dans l'environnement des bâtiments d'élevages avicoles. Vet. Res. **25**: 417-418.
- Toquin, M.T. and Lahellec, C. (1990). Fréquence des *Listeria* sur les carcasses de différentes espèces aviaires. Colloque SFM, Section Microbiologie Alimentaire, pp. 303-308.
- Toquin, M.T., Salvat, G., Eono, F. and Colin, P. (1993). La maîtrise du risque de *Listeria* dans les entreprises de charcuterie salaisons. Colloque SFM "Flash sur les microorganismes pathogènes" 96-106.
- Toquin, M.T., Michel, Y., Salvat, G., and Colin, P. (1995). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry flocks. 12th european symposium on the quality of poultry meat. Session on poultry microbiology. Saragoza, Spain, 25-29 September 1995, 205-214.
- Tripp, C.S., Wolf, S.F. and Unanue, E.R. (1993). Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis and interleukin 10 is a physiologic antagonist. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**: 3725-3729.
- Unnerstad, H., Danielsson-Tham, M.L., Waak, E. and Tham, W. (1995). Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes* : molecular typing of strains. In: proceedings of the XII International Symposium on Problems of Listeriosis, Perth, Western, Australia, 2-6 October 1995, p449.
- Urbaneck, D. (1961). Listériose expérimentale chez les animaux de laboratoire et chez les animaux domestiques. II : Pathologie de la listériose chez le cobaye. Arch. Experiment. Vet. **15**: 557-595 (Res. Rev. Med. Vet. 1962, 224).
- Urbaneck, D., Lehnert, Ch., Rittenbach, P. and Schleicher, J. (1963). Constatations morphologiques et bactériologiques dans la listériose cérébrale spontanée du mouton. Arch. Experiment. Vet. **17**: 717-750. (Res. Rev. Med. Vet. 1964, 234-235).
- Vaillant, V., Maillot, E., Charley, C. and Staïner, F. (1998). Epidémie de Listériose France- Avril-Août 1995. Réseau National de Santé Publique, pp. 58.
- Vaissaire, J. (1975) Communication personnelle
- Vaissaire, J. (2000) Epidémiologie des listérioses animales en France. Bull. Acad. Natle. Méd. **184**(2): 275-286.
- Vaissaire, J. et l'ensemble des directeurs des laboratoires d'analyse départementaux vétérinaires. (1999a). Les listérioses animales. Epidémiologie. Présentation. Juin 1999. Commission des maladies infectieuses. Acad. Nat. de Médecine.
- Vaissaire, J. et l'ensemble des directeurs des laboratoires d'analyses départementaux vétérinaires. (1999b). Les listérioses animales. Cas répertoriés en France en 1998 jusqu'en mai 1999. Bull. Acad. Vét. de France (sous presse).

- Vallée, A. (1952). Un cas de listériose du lièvre en France. *Ann. Inst. Past.* **83**: 832-833.
- Van Der Elzen, A.M. and Snijders, J.M. (1993). Critical points in meat production lines regarding the introduction of *Listeria monocytogenes*. *Vet. Quaterly* **15** : 143-145.
- Van Langendonck, N., E. Bottreau, S. Bailly, M. Tabouret, J. Marly, P. Pardon and P. Velge (1998). Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 337-46.
- Van Ulsen, F.W. (1952). Infecties met *Listeria monocytogenes*. *Tijdschrift voor Diegeneeskunde* **77**: 899-903.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M. and Labadie, J. (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 469-476.
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D. and Waites, W.M. (2000). Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *App. Environ. Microbiol.* **66**: 860-863.
- Vazquez-Boland, J.A., Gamallo, J.A., Ripio, M.T., Dominguez-Bernal, G., Lara, M., Vega, Y., Mainar, R.C. and Suarez, M. (1996). Listeriosis animal : aspectos epidemiológicos y diagnosticos, implicaciones en salud pública, y situacion en Espana. *Med. Vet.* **13**: 333-344.
- Vazquez-Boland, J.A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J. and Cossart, P. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell to cell spread. *Infect. Immun.* **60**: 219-230.
- Velani, S. and Roberts, D. (1991). *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp* in prepacked mixed salads and individual salad ingredients. *PHLS Microbiol. Dig.* **8**: 21-22.
- Verge, J. and Goret, P. (1941). Les maladies communes à l'Homme et aux Animaux : la listériose ou listérellose. *Rec. Med. Vet. T. CXVII.* **1**: 5-29.
- Vishinsky, Y., Grinberg, A., Khatib, N. and Porrit, R. (1995). Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*, clinical course and possible implications for human health. In Proceedings of the third IDF International Mastitis Seminar. - Tel Aviv Israël 28 May – 1 June 1995 (Edited by Saran A., Sobak S.).
- Waldeland, H., Loken, T. and Odegaard, O. (1993). Abortion in goats in Norway. *Et. et Synth. de l'I.E.M.V.T.* **42**: 549-550.
- Walker, J.K., Morgan, J.H., McLaughlin, J., Grant, K.A. and Shallcross, J. A. (1994). *Listeria innocua* isolated from a case of ovine meningoencephalitis. *Vet. Microbiol.* **42**: 245-253.
- Walker, S.J., Archer, P. and Banks, J.G. (1990). Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 157-162.
- Wallace, S.S. and Hathcock, T.L. (1995). *Listeria monocytogenes* septicemia in a foal. *J. Ann. Vet. Med. Ass.* **207** (10): 1325-1326.
- Wang, S.H., Yang, R.F., Guo, Z.B., Zhang, M.L., Liu, M.Y., Liu, Z.S. and Li, X.Z. (1997). Typing study on *Listeria monocytogenes* by random by amplified polymorphic DNA technique. *Chim. J. of Vet. Sci. Tech.* **27** (4) : 16-18.
- Wang, C., Zhang, L.F., Austin, F.W. and Boyle, C.R. (1998). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Ann. J. Vet. Res.* **59** (9): 1125-1128.
- Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R., and Schiff, G.M. (1986). Human rotavirus studies in volunteers : determination of infectious dose and serological response to infection. *J. Infect. Dis.* **154** (5): 871-880.
- Wardrope, D.D. and MacLeod, S.M. (1983). Outbreak of *Listeria* meningoencephalitis in young lambs. *Vet. Rec.* **113**: 213-214.
- Watkins, J. and Sleath, K.P. (1981). Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J. Appl. Bacteriol.* **50**: 1-9.
- Weber, A., Datzmann, C. and Potel, J. (1993). Isolation of *Listeria monocytogenes* from faecal samples of dogs and cats. *Tierärztliche Umschau* **48** (11): 727-730.
- Weber, A., Prell, A., Potel, J. and Schäfer, R. (1993). Vorkommen von *Listeria monocytogenes* bei Schlangen, Schildkröten, Echsen und Amphibien in der Heimtierhaltung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **106**: 293-295.
- Weber, A., Potel, J. and Schäfer-Schmidt, R. (1994). Untersuchungen zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* und anderen Listerien. Arten in Kotproben von Pferden. *Mh. Vet. Med.* **49**: 199-201.
- Weber, A., Potel, J. and Schäfer-Schmidt, R. (1995a). Untersuchungen zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Kotproben von Tauben. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **108**: 26-27.
- Weber, A., Potel, J., Schäfer-Schmidt, R., Prell, A. and Datzmann, C. (1995b). Untersuchungen zum Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in Kotproben von Haus-und Heimtieren. *Zentrablatt für Hygiene und Umweltmedizin* **198** (2): 117-123.

- Wegener, H.C., Norrung, B., Jensen, A., Embarek, P.K.B. and Tolstoy, A. (1993). *Listeria monocytogenes*. En oversigt. Dansk Veterinaertidsskrift **76** (12): 501-502, 504-512.
- Weis, J. and Seeliger, H.P.R. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. **5**: 29-32.
- Welchman, D. de B., Hooton, J.K. and Low, J.C. (1997). Ocular disease associated with silage feeding and *Listeria monocytogenes* in fallow deer. Vet. Rec. **28**: 684-685.
- Welsh, R.D. (1983). Equine abortion caused by *Listeria monocytogenes* serotype 4. J. Am. Vét. Assoc. **182**: 291
- Welshimer H.J. (1960). Survival of *Listeria monocytogenes* in Soil. J. Bacteriol. **80**: 316-380.
- Welshimer, H.J. (1963). Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. J. Bacteriol. **85**: 1156-1159.
- Welshimer, H.J. (1968). Isolation of *Listeria monocytogenes* from vegetation. J. Bacteriol. **95**(2): 300-303.
- Welshimer, H.J. and Donker-Voet, J. (1971). *Listeria monocytogenes* in nature. Appl. Microbiol. **21**(3): 516-519
- Wernars, K., K. Heuvelman, S. Notermans, E. Domann, M. Leimeister-Wachter and Chakraborty, T. (1992). Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria spp.* Appl. Environ. Microbiol. **58**: 765-8.
- Wherry, J.C., Schreiber, R.D. and Unanue, E.R. (1991). Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice: roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. Infect. Immun. **59**: 1709-1715.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Knorr, R., Bodis, M., Cole, E.M., Mc Dowell, C.I., Mc Donough, P.L and Batt, C.A. (1996). Ribotype diversity of *listeria monocytogenes* shaws associated with outbreaks of listeriosis in ruminants. J. Clin. Microb. **34**: 1086-1090.
- Wiedmann, M., J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough and Batt, C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. Infect. Immun. **65**: 2707-16.
- Wilesmith, J.W. and Gitter, M. (1986). Epidemiology of ovine listeriosis in Great Britain **119**: 467-470.
- Wilkerson, M.J., Melendy, A. and Stauber, R.E. (1997). An outbreak of listeriosis in a breeding colony of chinchillas. J. Vet. Diagn. Invest. **9**: 320-323.
- Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm, T. (1992a). Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests. part I. Lebensmittel-Wissenschaft und Technology, **25**: 43-49.
- Wirtanen, G. and Mattila-Sandholm, T. (1992b). Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. part II. Lebensmittel-Wissenschaft und Technology, **25**: 50-54.
- Wolter, R. (1971). Le rationnement de la vache laitière à partir de l'ensilage de maïs. Bull. mens. Vet. Prat. Fr. **55**: 248-279.
- Woo-Sam, N.H. (1999). Listeriosis in a Holstein cow. Can. Vet. J. **40**: 506-508.
- Wuthe, H.H. and Schönberg, A. (1999). Listeriose beim Feldhasen in Norddeutschland. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **112**: 98-99.
- Yang, V.L., Ding, W., Ma, H.L., Zhou, Z.J., Xu, K.C. and Zhang, R.T. (1994a). Studies on biotin-labelled oligonucleotide probe for detection and identification of *Listeria monocytogenes* in pork and milk. Act. Agric. Bor. Sinica. **9** :71-74.
- Yang, B.L., Nie, X.T., Ma, H.L., Yang, S.Z., Zhou, Z.J., Xu, K.C., Zhang, R.T. and Liu, C.J., (1994b). Species specific detection of *Listeria monocytogenes* by using the polymerase chain reaction. Acta. Vet. et Zoot. Sinica. **25** 353-358.
- Yokoyama, E., Maryama, S. and Katsube, Y. (1998). Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. **40**: 133-137
- Yu, L.S.L., Prasai, R.K., and Fung, D.Y.C. (1995). Most probable numbers of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility Enrichment. J. Food Protect. **58**: 943-943.
- Zakia, A.M., Layla, I.M. and Nour el Sham, D.M. (1993). First record of septicemic listeriosis in sheep in the Sudan. Bull. of An. Health and Rod. In Africa. **41** (1) : 1-4.
- Zundel, E., Pardon, P., Henard, J.L., Heuchel, V., Marquet-Vander Mee, V., Audurier, A., Verneau, D., Pelloquin F. and Bernard, N., (1999). *Listeria monocytogenes* : Repérer et éliminer les chèvres excrétrices. Chèvre **225** : 32-35.
- Zwietering, M.H., de Koos, J.T., Hasenack, B.E., de Wit, J.C. and van't Tiet, K. (1991). Modeling of bacterial growth as a function of temperature. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1094-1101.

ANNEXE 1 : FORMES CLINIQUES DES LISTÉRIOSES CHEZ L'ANIMAL

Espèces	Formes cliniques	Publications particulières	Publications de synthèse ou générales
■ Bovins – Ovins – Caprins Bovins	formes abortives formes nerveuses formes septicémiques formes oculaires formes mammaires formes digestives	Bienfet <i>et al.</i> 1969 ; Goyon et Lecomte 1957 ; Bind et Delaval 1993 ; Schelcher et Sanaa 1993 ; Cheve et Gauthier 1961 ; Lecoanet 1973 ; Smith et Sundquist 1960 ; Joncour 1998 ; Jack 1961 ; Welchman <i>et al.</i> 1997 ; Seeliger 1971 ; Lecoanet 1973 ; Bemrah <i>et al.</i> 1997 ; Erdogan <i>et al.</i> 1997 ; Lecoanet 1973 ; Cottureau 1972 ; Goyon et Lecomte 1957 ; Gray et Killinger 1966	Osebold <i>et al.</i> 1960 ; Gray 1960b ; Gray 1958a ; Erdogan <i>et al.</i> 1997 ; Roots et Strauch 1958 ; Goret et Oudar 1965 ; Maupas <i>et al.</i> 1971 ; Maupas <i>et al.</i> 1976 ; Stahl <i>et al.</i> 1996 ; Pardon <i>et al.</i> 1994 ; Nicolas <i>et al.</i> 1987 ; Seeliger et Höhne 1979 ; Verge et Goret 1941 ;
Buffle Ovins	formes nerveuses formes abortives formes oculaires formes digestives	Urbaneck <i>et al.</i> 1963 ; Belin et Lagriffoul 1943 ; Spencer <i>et al.</i> 1945 ; Graham <i>et al.</i> 1940 ; Eieland et Finborud 1950 ; Walker <i>et al.</i> 1994 ; Bind et Delaval. 1993 ; Naerlana 1950 ; Schelcher et Sanaa 1993 ; Clegg et Blandford 1965 ; Chand et Sadana 1999 (<i>L. ivanovii</i>) ; Dijkstra et De Vries 1962 ; Wardrope et McLeod 1983 ; Saurat <i>et al.</i> 1959 ; Gitter <i>et al.</i> 1986 ; Charton <i>et al.</i> 1962 ; Wilesmith et Gitter 1986 ; Goyon 1972 ; Cheve et Gauthier 1962 ; Lecoanet 1973	Biester et Schwarte 1939 Olson et Segre 1956 ; Molello et Jensen 1964 ; Gray 1958a ; Dedie 1958 ; Moraillon et Yalcin 1967 ; Brugere-Picoux 1994 ; Seeliger 1971 ; Lucas <i>et al.</i> 1955 ; Verge et goret 1941 ; Maupas <i>et al.</i> 1971 ; Nicolas <i>et al.</i> 1988 ; Verge et Goret 1941
Caprins	formes nerveuses formes abortives	Okimasa <i>et al.</i> 1957 ; Naerlana 1950 Goyon 1972 ; Lecoanet 1973	Gray 1958a ; Danielsson-Tham <i>et al.</i> 1997 ; Gray et Killinger 1966 ; Seeliger et Hohne 1979
■ Equins	formes plus rares mais décrites et/ou constatées actuellement formes nerveuses formes abortives formes septicémiques formes digestives (poulain)	Lucas et Seeliger 1957 ; Vaissaire 2000 ; Wallace et Hathcock 1995 ; Collobert-Laugier 1990-1991 ; Belin 1946 ; Seeliger et Linzenmeier 1955 ; Welsh 1983 ; Grini 1943 ; Weber 1994	Gray 1958a ; Rouse 1999 ; Gray et Killinger 1966
Baudet ■ Porcins	formes rares mais décrites et/ou constatées actuellement formes nerveuses essentiellement mais peuvent guérir spontanément (jeunes) très souvent porteurs sains formes digestives	Bind et Delaval. 1993 ; Nicolas <i>et al.</i> 1987 ; Biester et Schwarte 1940 ; Eveleth <i>et al.</i> 1953 ; Van Ulsen 1952 ; Goyon 1972 ; Schlegel et Oprecht 1955	Gray et Killinger 1966

Espèces	Formes cliniques	Publications particulières	Publications de synthèse ou générales
■ Carnivores <u>chiens-chats (très rares)</u>	formes nerveuses chez jeunes animaux, associées ou non à d'autres pathologie – formes conjonctivale formes septicémique formes cutanée formes conjonctivales formes digestives	Weber 1993 ; Schoroeder et Van Rensburg 1993 ; Longarevic <i>et al.</i> 1999 ; Schoroeder et Van Rensburg 1993 ; Weber <i>et al.</i> 1993	Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966
■ Lagomorphes <u>lapin domestique</u> <u>lièvre</u>	formes abortive et/ou génitale (pyomètre) formes nerveuses formes septicémiques formes mammaires formes respiratoires formes conjonctivales formes digestives formes cutanée et sous cutanée	Wuthe et Schönberg 1999 ; Seeliger 1971 .Vaissaire 1975 ; Lucas et Seeliger 1957 ; Duée et Moine 1964 ; Vaissaire 1975 ; Vaissaire 2000 ; Vallée 1952 ; Abd-El Ghaffar et Abd-Elgwad 1997 ; Goyon 1972	Lesbouyries 1943 ; Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966 ; Maupas <i>et al.</i> 1971
■ Rongeurs <u>Rat</u> <i>Rattus rattus</i> <i>Rattus norvegicus</i> <u>Souris</u> <u>Cobaye</u> <u>Chinchilla</u> <u>Ecureuil</u> <u>Gerbille</u> <u>Rat musqué – Rat d'eau</u> <u>Gerboise</u> <u>Lemming</u> <u>Campagnol</u> <u>Cabiai</u>	portage formes septicémiques formes nerveuses formes génitales formes digestives formes respiratoires formes conjonctivales porteurs sains importants	Inoue <i>et al.</i> 1992 ; Okisama <i>et al.</i> 1957 ; Urbaneck 1961 ; Ghenne <i>et al.</i> 1969 ; Jacotot <i>et al.</i> 1956 ; Wilkerson <i>et al.</i> 1997 Vallee 1952 ; Plumer et Byrne 1950	Gray 1958a ; Seeliger 1971 ; Maupas <i>et al.</i> 1971 ; Gray et Killinger 1966 ; Verge et Goret 1941 ;
■ Insectivore <u>Musaraigne</u>	formes septicémiques portage	Gray 1958 a ; Gray et Killinger 1966 ;	
■ Faune sauvage <u>Renard argenté</u> <u>Raton laveur</u> <u>Mouffette (sconse)</u> <u>Furet</u> <u>Vison</u> <u>Martre</u> <u>Zibeline</u> <u>Cerf – Daim – Biche</u> <u>Léopard</u> <u>Coyotte</u> <u>Ouistiti</u>	formes septicémiques formes respiratoires formes septicémiques formes conjonctivales formes pulmonaires	Black <i>et al.</i> 1996 ; Vallee 1952 ; Plumer et Byrne 1950	Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966 ; Gray et Killinger 1966 ; Gray 1958a

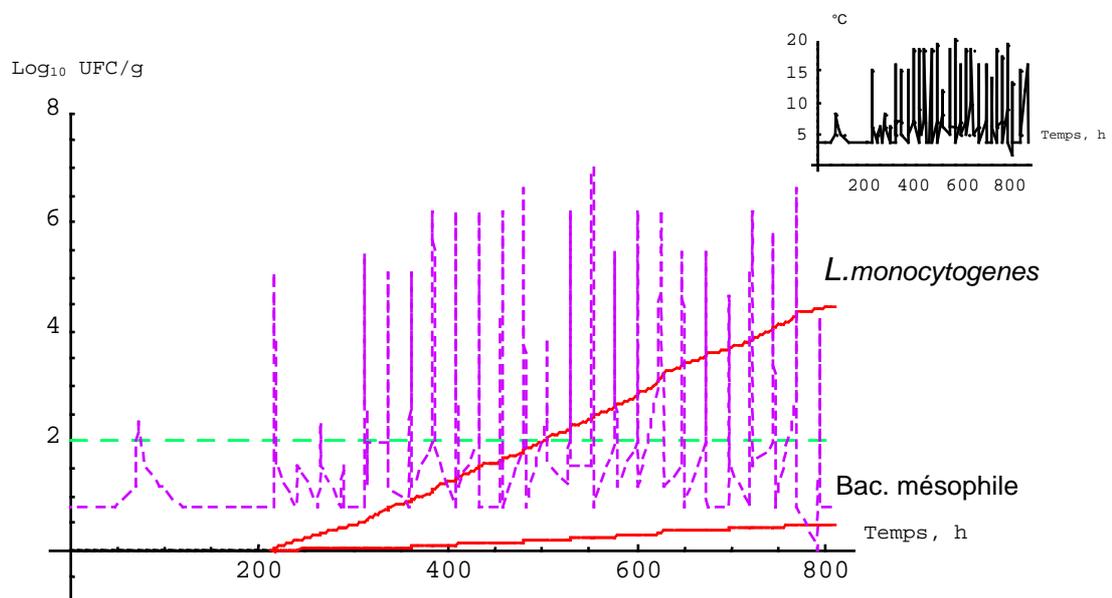
Espèces	Formes cliniques	Publications particulières	Publications de synthèse ou générales
■ Oiseaux <u>Poule, poulet, poussin</u> <u>Dinde, pintade</u> <u>Oie</u> <u>Canard</u> <u>Pigeon, colombe (portage)</u> <u>Gibier à plumes</u> Canard Coq de bruyère Perdrix, Faisan <u>Oiseaux de volière</u> Canari Perroquet <u>Oiseaux sauvages</u> Aigle Hibou Merle – Mouette Freux – Corbeau Grue	portage : formes septicémiques formes conjonctivales formes digestives formes rénales formes cardiaques formes nerveuses formes septicémiques portage formes septicémiques formes conjonctivales portage	Longarevic <i>et al.</i> 1994 ; Lucas <i>et al.</i> 1955 ; Lucas et Seeliger 1957 ; Forgeot <i>et al.</i> 1941 ; Cheve et Gauthier 1961 ; Seeliger 1971 ; Paterson 1937 ; Evan Jones 1953 ; Belding et Mayer 1957 ; Van Ulsen 1952 ; Pardon <i>et al.</i> 1994 ; Lucas <i>et al.</i> 1962 ; Weber <i>et al.</i> 1995 ; Pallaske 1941 ; Vallée 1952 ; Lillegrein 1942 ; Lucas <i>et al.</i> 1962 ; Peters et Born-Stapp 1997 ; Fenlon 1985 ; Bouttefroy <i>et al.</i> 1997	Seeliger 1971 ; Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966 ; Seeliger et Linzenmeier 1955 ; Maupas <i>et al.</i> 1971 ; Stuart Paterson 1937 ; Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966
■ Poissons <u>Truites</u> <u>Carpes</u> <u>Tanches</u> <u>Silure (poisson-chat)</u>	formes septicémiques formes cutanées portage	Thibault <i>et al.</i> 1963 ; Goyon 1972 ; Wang <i>et al.</i> 1998	Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966
■ Batraciens <u>Grenouilles, Crapauds</u> <u>Salamandes</u> ■ Reptiles <u>Ophidiens (serpents)</u> <u>Cheloniens (tortues)</u>	portage <i>L. monocytogenes</i> + autres portage <i>L. monocytogenes</i> + autres	Weber <i>et al.</i> 1993 Weber <i>et al.</i> 1993	Gray 1958a ; Gray et Killinger 1966
■ Arthropodes <u>Crustacés</u>	portage		Gray et Killinger 1966 ; Gray 1958a ;

ANNEXE 2 : EXPLORATION PAR SIMULATION DES FACTEURS MODULANT LA DLC

L'outil actuel de simulation de la dynamique des densités bactériennes, employé conformément à ce qui est exposé section J, permet de simuler la croissance à partir d'un inoculum donné et de prévoir le délai pour l'obtention d'une densité bactérienne donnée. Il est donc possible, connaissant une estimation de l'inoculum en fin de procédé et des conditions réalistes de conservation, de donner une estimation crédible de la DLC. Le programme actuel et son emploi conduisent plutôt à des résultats « sécuritaires » (voir section J).

Influence des propriétés physiologiques de *L. monocytogenes*

La croissance relativement rapide de *L. monocytogenes* à basse température est le point majeur de fixation des DLC d'un point de vue risque infectieux. La simulation ci-dessous compare le développement de *L. monocytogenes* et d'une bactérie mésophile ayant les mêmes taux de croissance et temps de latence dans l'aliment (la différence n'est due qu'à une température minimale de croissance inférieure à zéro degrés pour *L. monocytogenes*) :



NB : La ligne en continu représente la population bactérienne (logarithmes), la ligne en petits pointillés (ainsi que la vignette) représente la température et la ligne horizontale en pointillés le seuil critique.

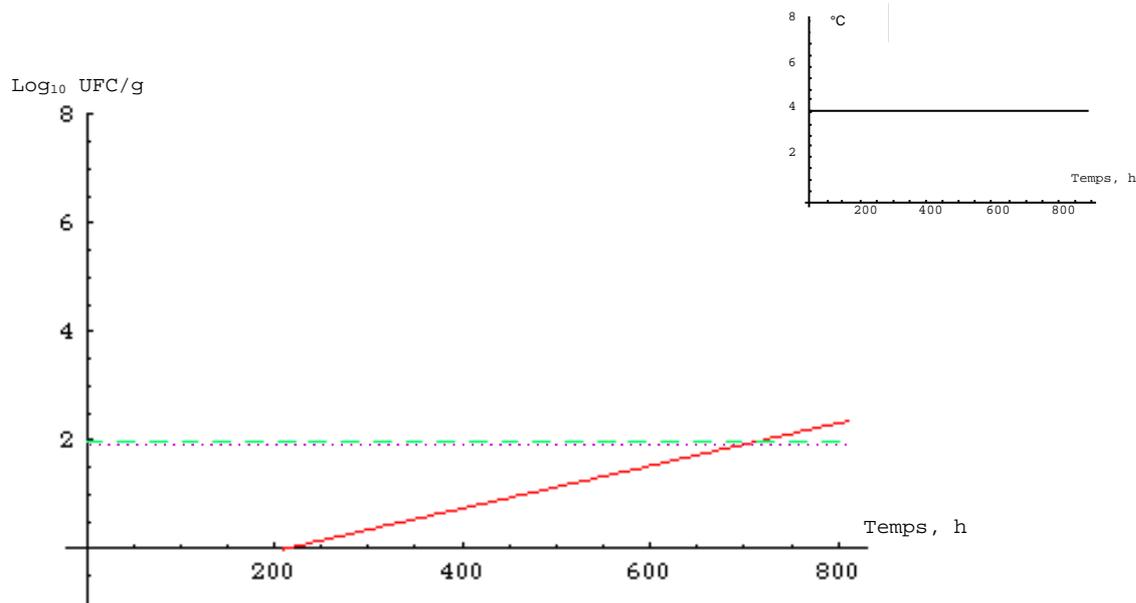
Toutes les simulations (sauf mention contraire) partent d'une contamination initiale de 1 *L. monocytogenes*/g pour simplifier la représentation. Elles sont basées sur des estimations considérées comme réalistes mais en aucun cas elle ne sont des simulations destinées à être utilisées pour fixer la DLC. Les paramètres correspondant à la contrainte du produit sur la croissance sont d'ailleurs volontairement différents dans plusieurs des paragraphes suivants. Dans les comparaisons, les mêmes valeurs de paramètres sont, bien entendu, utilisées. Les simulations ne sont donc que des exemples et doivent être prises comme telles. Le logiciel utilisé pour les simulations est « ASK_ME » version 2.1 de L. Rosso et JP. Flandrois et est la propriété du CNRS et de l'Université Lyon1 (UMR 5558).

La nécessité de prendre en compte des scénarios réalistes vient de façon évidente de l'inaptitude qu'ont des températures inférieures à 10°C de ralentir suffisamment le développement de *L. monocytogenes*. Pour des bactéries mésophiles, la différence entre un scénario simpliste et un scénario réaliste ne sera pas aussi important que pour *L. monocytogenes*. Bien entendu, dans les mêmes conditions thermiques, une bactérie à croissance très rapide dans l'aliment devrait aussi être considérée.

Le scénario de vie doit être réaliste

Dans la simulation ci-dessous, un même produit (rillettes ou pâté) est contaminé par une *L. monocytogenes*/25g. Les valeurs des paramètres introduits dans le modèle sont réalistes mais ne sauraient

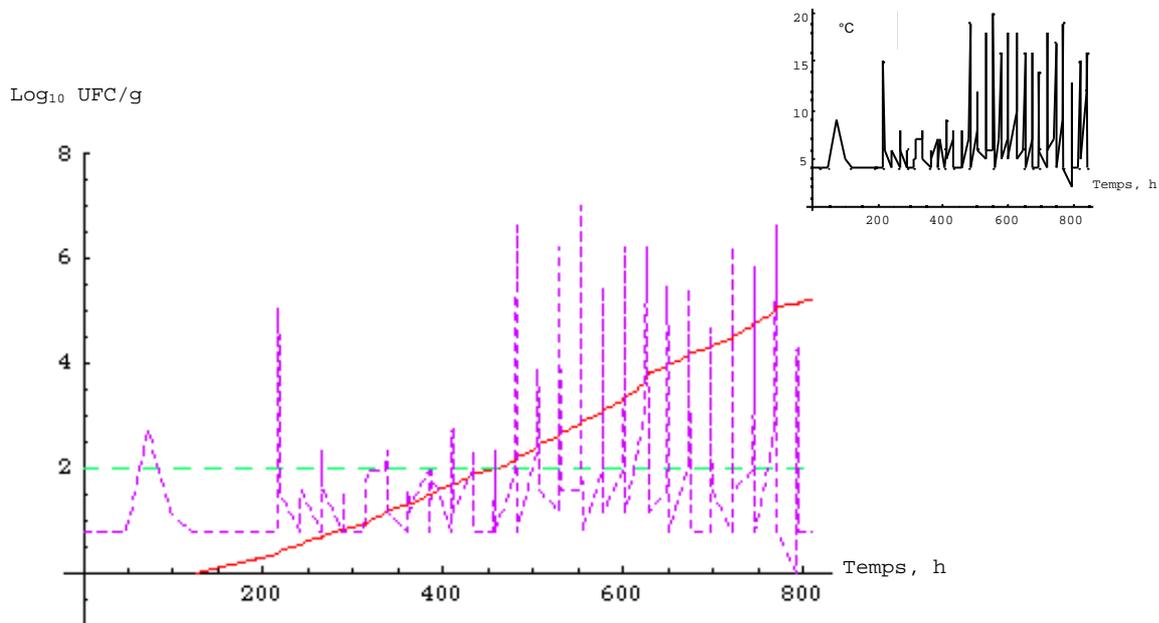
convenir à toutes les rillettes ou à tous les pâtés. Le scénario présenté ci-dessous est un séjour à 4°C sans variations :



NB : La ligne en continu représente la population bactérienne (logarithmes), la ligne en petits pointillés (ainsi que la vignette) représente la température et la ligne horizontale en pointillés le seuil critique.

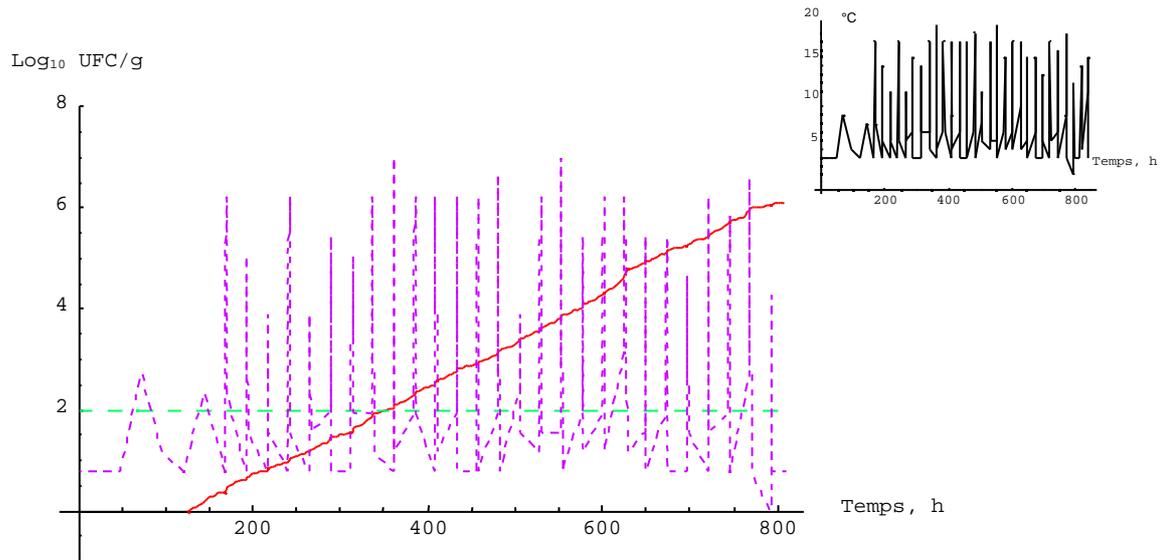
La DLC obtenue est de 700 heures après la sortie de fabrication. Ce produit n'a jamais voyagé, ni été vendu ni consommé.

Si, maintenant, une variation de température minimale (9°C) existe dans les phases de sortie du stockage initial du transport puis de la mise en linéaire et que par ailleurs le consommateur achète et transporte le produit (et provoque ainsi une hausse de température plus forte) avant de le conserver dans un réfrigérateur domestique (température ne dépassant pas 8°C), mais qu'il attende avant de le consommer à intervalles réguliers, on obtient le cas suivant :



La DLC obtenue dans ce scénario plus réaliste est de 450 heures. La consommation commence malencontreusement dans ce scénario après la DLC.

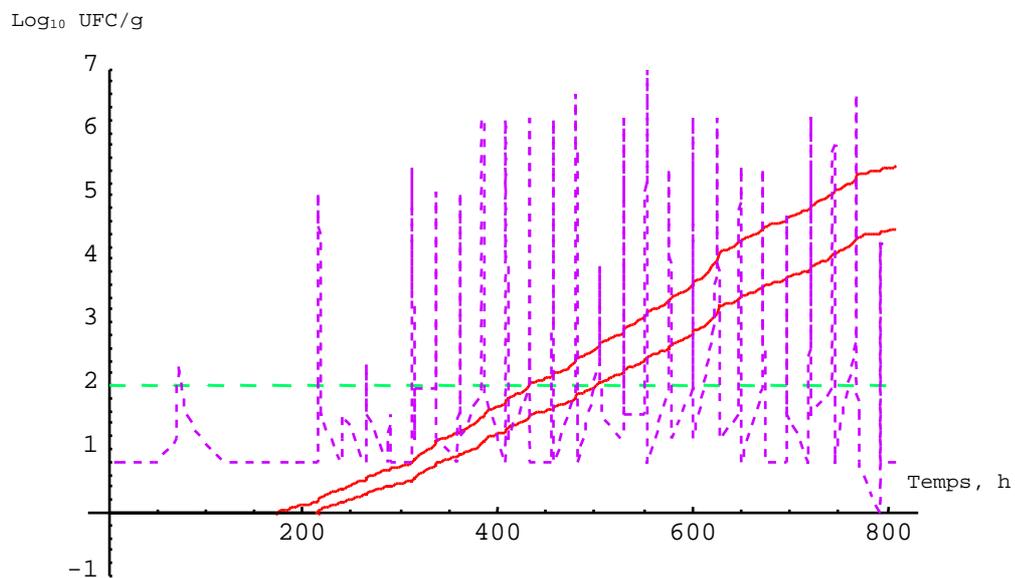
Le troisième scénario part sur des bases identiques, mais l'achat se passe dans de meilleures conditions (peu de variation thermique), en revanche le produit est consommé dès le lendemain :



La DLC qui tient compte de la mise sur la table du produit pendant un repas par jour tombe à 350 heures. On voit bien les accélérations de croissance dues à la montée thermique lors de la mise sur table.

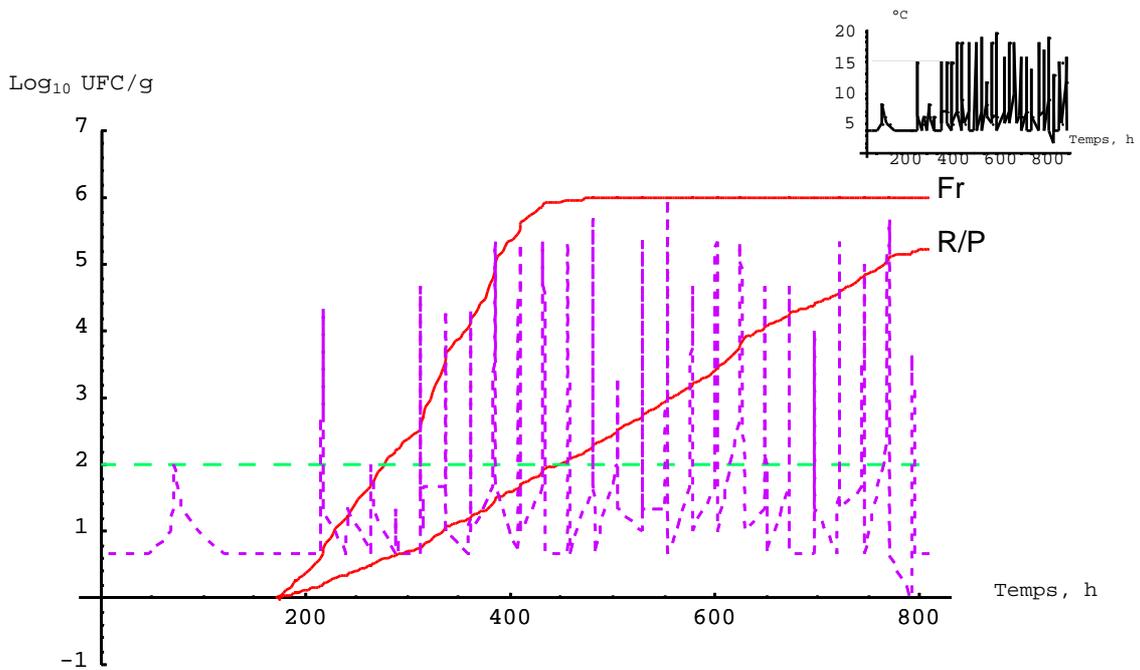
La DLC dépend de l'aliment

La double simulation ci-dessous montre la différence entre deux produits de la même classe se distinguant par une différence d' a_w (due notamment à des concentrations différentes de sel), de composition avec le profil thermique ci-dessus.



Pour un même type de produit, les DLC peuvent varier aussi en fonction de la composition du produit. La teneur en sel, en graisses, en nitrites et l' a_w , mais aussi le type de viande, le mode cuisson et la préparation etc. agissent sur les paramètres de croissance de la bactérie et donc modifient la DLC de plusieurs jours. Ces différences de composition se manifestent dans la simulation par une différence de 0,07 sur les valeurs de μ_{max} et de 1h sur le Lag_{min} est d'une cinquantaine d'heures.

Les mêmes scénarios de vie d'un produit servent à la simulation du devenir de la même population de *L. monocytogenes* (1 *L. monocytogenes*/g) dans un fromage à pâte molle (Fr) et ceci comparativement au cas précédent (R/P) :



Comme précédemment, les paramètres utilisés sont proches de ceux rencontrés dans ce cas mais ne conviennent pas à la totalité des produits de ce type. Les DLC pour un même inoculum initial sont très différentes. On observe bien que la densité de *L. monocytogenes* est plus forte à une date donnée dans le fromage.

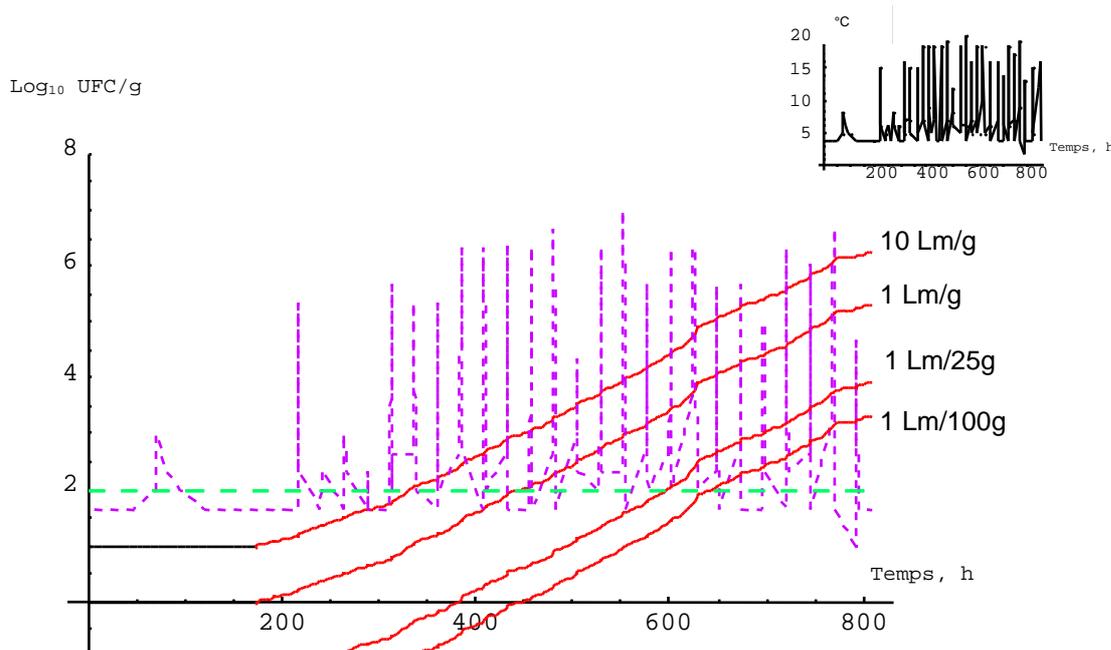
La Date Limite de Consommation dépend de la contamination initiale

Ceci est aisé à comprendre si l'on considère que la croissance de la bactérie dans sa plus simple expression est l'exponentielle :

$$N = N_0 e^{\mu T}$$

avec μ le taux de croissance, N , la population bactérienne au temps T et N_0 l'inoculum initial. Le temps pour atteindre une population bactérienne donnée ne dépend QUE de N_0 pour une bactérie donnée.

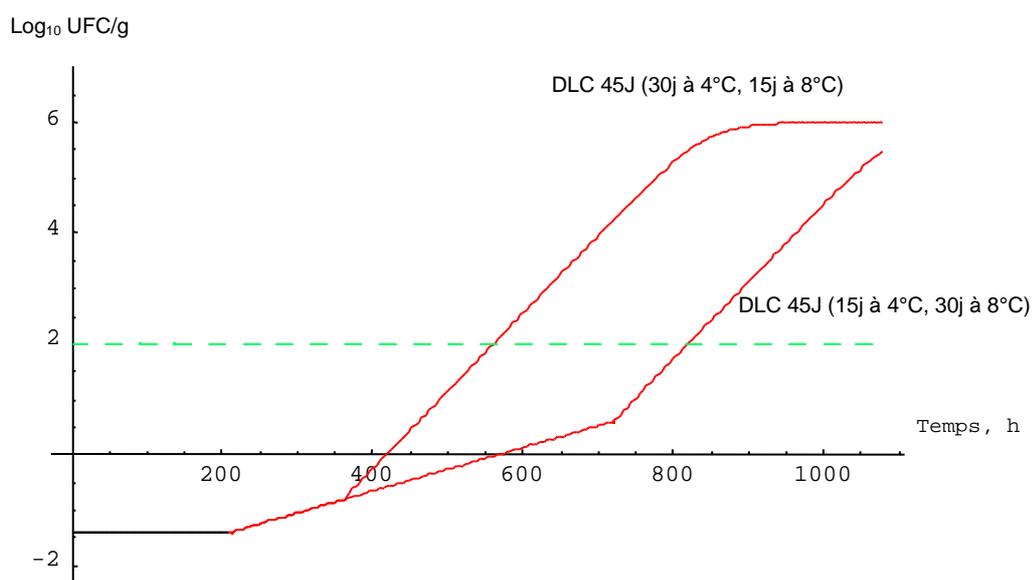
Cet effet est bien visualisé en condition réalistes de profil thermique (cas d'un pâte) pour quatre contaminations initiales par les simulations superposées suivantes :



Les DLC sont alors respectivement de 634, 598, 489, 335 heures pour des contaminations de 1 *L. monocytogenes*/100g, 1 *L. monocytogenes*/25g, 1 *L. monocytogenes*/g et 10 *L. monocytogenes*/g. Appliquer des méthodes strictes d'hygiène permettant d'abaisser le taux de contamination initial très au-dessous de 1 *L. monocytogenes*/g (1 *L. monocytogenes*/100g) permet de gagner ainsi d'assurer plus de 600 heures de conservation en toute sécurité (26 jours) et ceci dans des conditions d'utilisation du produit. Ce gain de conservation est donc une "prime" à la qualité de la fabrication. On voit au passage que les contaminations initiales supérieures ou égales à 1 *L. monocytogenes*/g donnent des DLC qui ne protègent pas le consommateur lors de la phase d'utilisation du produit (les paramètres utilisés sont ceux correspondant à certaines rillettes ou pâtés).

La DLC ne peut pas être fixée arbitrairement

La simulation suivante concerne des rillettes ou des pâtés pour lesquels le distributeur et le fabricant s'accordent sur une DLC de 45 jours. L'inoculum de la simulation a été fixé à 1 *L. monocytogenes*/25g et les deux profils thermiques sont souvent utilisés pour valider les DLC fixées de cette façon par des tests de vieillissement (ils apparaissent dans la norme AFNOR XP V01-003):



À la DLC de 45 jours (1080 heures), on voit bien que le nombre critique de 100 *L. monocytogenes*/g est, dans les deux hypothèses, largement dépassé. Notons aussi que ceci est obtenu malgré le profil thermique irréaliste (variation de 4 à 8°C seulement en deux phases) et que l'inoculum est idéalement faible.

Ceci montre que les DLC ne peuvent pas être déterminées de façon volontariste (en fixant la durée puis en cherchant les moyens de l'obtenir) : c'est la bactérie, le produit et le scénario de vie qui conditionnent la DLC et non l'inverse.

Remarques conclusives de cette annexe

D'une façon générale la DLC doit être définie à partir de scénarios de vie réalistes et prendre en compte les divers types de circuits de distribution, les modes de vente, les modes de consommation. Des pratiques commerciales contractuelles peuvent aussi influencer sur la DLC en améliorant les conditions de conservation (par exemple conservation à 2°C au lieu de 4°C). La norme AFNOR XP V01-003 n'est donc pas réellement satisfaisante, elle ne peut pas être considérée comme sérieusement sécuritaire.

Il faut aussi, bien entendu, prendre en compte les caractères de la bactérie et de l'aliment. La difficulté vient des différences potentielles entre aliments d'un même type.

La fixation de l'inoculum initial mérite une attention particulière car il conditionne, plus que les autres facteurs, une estimation réaliste de la DLC. Le niveau de contamination dépend du niveau d'hygiène du processus de fabrication ou du moins des phases suivant un processus assainissant. La pratique de l'HACCP conduit à une réduction du niveau de contamination initiale. Le niveau de la contamination va donc dépendre de la pratique industrielle qui va donc influencer sur la DLC. Il existe une prime à la qualité en terme de DLC. C'est le seuil de sensibilité de la technique de dénombrement qui devrait être utilisée dans les tests de vieillissement pour les

aliments concernés par la règle « moins de 1 L. monocytogenes/25g ». La norme AFNOR XP V01-003 ne tient pas compte de cette définition d'un niveau de contamination réaliste .

Il paraît difficile, en dehors de produits comme le lait cru dont la composition, le pH, l'aw, la teneur en sel, le type d'acide contenu et autres facteurs modulant la dynamique des populations bactériennes, est stable, de fixer arbitrairement une longueur de DLC.

La DLC dépend du type de scénario de vie du produit et là encore les pratiques commerciales (contractuelles) peuvent modifier un scénario fondé sur les pratiques habituelles.

Les trois points ci-dessus vont à l'encontre de la fixation réglementaire de la DLC. Si toutefois cette fixation devait être faite, outre que tous les points conclusifs devront être pris en compte, il faudra fixer une DLC plus courte que la DLC potentielle afin de prendre en compte les variations dues aux aliments, aux scénarios de vie, aux différences d'objectif de qualité des entreprises.

L'étiquetage doit être suffisamment informatif pour permettre d'informer le consommateur sur les caractéristiques du scénario de vie du produit utilisé dans les simulations ou tests. Il conviendrait de faire figurer les conditions de stockage par les particuliers, dont la durée de conservation dans les réfrigérateurs domestiques et le délai de conservation après ouverture.

La température de ces réfrigérateurs ne peut pas être assurée avec le même niveau de reproductibilité et de fiabilité que celle des chambres froides industrielles. Des solutions techniques doivent être particulièrement étudiées pour éviter ces problèmes. L'ensemble de ces difficultés ne doivent cependant pas conduire à accepter la pérennisation de la situation actuelle.

ANNEXE 3 : CONTRIBUTIONS REÇUES PAR LA COMMISSION SUITE À LA PUBLICATION DU RAPPORT INTERMÉDIAIRE

- Contribution de la Sarl ASEPT et de l'Association ASEPT

« Suite à votre proposition de nous permettre de réagir, d'appeler l'attention sur des travaux non cités ou d'apporter des précisions, nous vous faisons parvenir dans le document ci-joint nos commentaires concernant le rapport intermédiaire de la " Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes* ".

Le texte ci-après a été rédigé par les membres de la Sarl ASEPT et de l'Association ASEPT.

Pour information, un dossier *Listeria* a été ouvert sur notre site internet à l'adresse suivante : <http://www.asept.fr/Lm.htm>

Je vous remercie de l'intérêt que vous porterez à la lecture de ce document.

Remarques préliminaires

Deux remarques :

1. Dans le texte de Martin HIRSCH "Actualisation de l'évaluation du risque lié à *Listeria monocytogenes*", des précisions sont souhaitées concernant la citation suivante page 10 : « Les laboratoires agréés devraient également être tenus de transmettre sans délai les souches alimentaires contaminées à une banque nationale de données etc. »

Un exemple simple : le laboratoire de l'ASEPT effectuant des analyses de recherche de *L. monocytogenes* à partir de divers produits alimentaires est-il concerné par cette disposition ?

Le mot « agrément » signifie-t-il agrément pour les analyses microbiologiques en vue de l'exportation d'aliments ?

Dans quelles conditions se ferait l'envoi des souches : confidentialité et prise en charge du coût d'envoi des souches isolées, etc.

2. Nous respectons les membres de la Commission pour leur qualité scientifique mais nous nous demandons pourquoi aucun scientifique issu du milieu industriel en fait partie.

Page 11, Section A : Physiologie de *L. monocytogenes*

Il serait intéressant de préciser que le comportement de *Listeria monocytogenes* est souche dépendant quelque soit les facteurs étudiés (pH, température, etc.), les aliments (laits, fromages, etc.). Il n'est pas fait mention de l'influence de facteurs (pH, température, concentration en NaCl, etc.) en présence d'autres facteurs sur le comportement de *L. monocytogenes*. Notamment, les effets de la température, du pH et de la concentration en NaCl sur la croissance sont fortement interdépendants. À titre d'exemple, le pH minimum de croissance dépend de la souche étudiée, de l'acide, de la température d'incubation, de la composition nutritive du milieu, de la concentration en NaCl ou autres sels et de la présence d'inhibiteurs (Ralovich, 1992 ; Jay, 1996).

Ralovich, B. 1992. Data for properties of *Listeria* strains (a review). *Acta Microbiologica Hungarica*. 39:105-132.

Jay, J.M. 1996. Foodborne Listeriosis. In "Modern Food Microbiology 3. Ed. Chapman et Hall (International Thomson Publishing), Paris. New York. Food Science Text Series. Chapter 22, pp 478-506.

Page 15 : Désinfection et conservateurs

L'efficacité des opérations de nettoyage et de désinfection dépend de divers facteurs tels que le temps d'action, l'action mécanique, la concentration, la présence de matières organiques et la température. Ces facteurs ne sont pas tous abordés. Ils sont abordés dans les travaux suivants :

Spoilage and Safety of cold smoked fish. FAIR project CT 95 – 1207. Topic 2, Contamination of cold smoked fish with *Listeria* spp and *L. monocytogenes*.

GAY M. and BOURION F., 2000. Efficiency of Sanitation Procedures against *Listeria monocytogenes* : Application to cold fish industry in France . International Association for Food Protection. 87th Annual Meeting : August 6 – 9, 2000 Atlanta, Georgia.

Page 16, § 33

Vous rapportez que quelle que soit la bactériocine considérée, des résistances croisées aux bactériocines puissent apparaître rapidement en ne citant qu'une seule étude. A ma connaissance, d'autres travaux existent et montrent qu'il n'y a pas d'apparition de résistance croisée lorsque les bactériocines considérées sont de classes différentes (Bouttefroy, 1999 ; Schillinger *et al.*, 1998 ; Rasch and Knochel, 1998). Par ailleurs différentes observations d'industriels laitiers vont en ce sens mais n'ont pas été publiées.

Bouttefroy, A. 1999. Inhibition de *Listeria monocytogenes* par des combinaisons de bactériocines Nisine, Curvaticine 13 - Facteurs influençant leur efficacité en milieu de laboratoire et en technologie fromagère. Thèse INPL, Nancy

Rasch, M. and Knochel, S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin, pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett. Appl. Microbiol.* 27(5):275-8.

Schillinger U, Chung HS, Keppler K, Holzappel WH. 1998. Use of bacteriocinogenic lactic acid bacteria to inhibit spontaneous nisin-resistant mutants of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Applied Microbiology* 85(4):657-63.

Page 17, Section B : Isolement et identification de *Listeria monocytogenes*

Question n°8

Il n'est pas fait mention de l'utilisation de méthodes non officielles par les organismes chargés des contrôles officiels alors qu'ils sont sensés toujours appliquer des méthodes normalisées.

On ne parle pas des méthodes d'identification : Camp Test, hémolyse, utilisation des sucres ; alors que ces techniques font partie intégrante des méthodes de détection. À développer davantage en expliquant les principes ou faire un renvoi à la question n°1.

Page 18, § 42

Ajouter en fin de paragraphe " L'étude préliminaire permet de déterminer la justesse de la méthode commerciale par rapport à une méthode de référence, sa limite de détection et sa spécificité. Les essais interlaboratoires permettent de déterminer la répétabilité et la reproductibilité de la méthode commerciale. Les essais sont menés par un laboratoire expert. Toutes les règles de fonctionnement de cette validation sont fixées par la Commission de validation des méthodes alternatives au sein de l'AFNOR ".

Page 18, § 44

Ajouter en fin de paragraphe " Les règles de la validation européenne ont été fixées par le Comité Général de Microval et sont disponibles dans le document "Microval Rules and Certification Scheme - Version 2 - Mai 1999".

Page 19 : Echantillonnage

Il serait intéressant de mentionner les recommandations de l'ICMSF concernant les plans d'échantillonnage à appliquer pour détecter *L. monocytogenes* .

ICMSF. 1994. Choice of sampling plan and criteria for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of food Microbiology.* 22 : 89-96.

Page 21, § 76 et 81

Le réseau Pulsnet a été mis en place en 1995 par le CDC (Central Disease Center-USA) en partenariat avec des laboratoires médicaux publics de différents états et le département de sécurité alimentaire (USDA-FSIS). Le réseau Pulsnet joue un rôle important dans la surveillance des bactéries pathogènes circulant aux USA et l'investigation d'une enquête épidémiologique. Il consiste à établir une banque de données informatique regroupant tous les profils génétiques de différents pathogènes alimentaires ou non. Les profils génétiques des souches bactériennes sont obtenues avec la technique d'électrophorèse en champs pulsés (ou PFGE). A chaque souche correspond un pulsotype qui lui est propre. Le CDC a développé des méthodes PFGE standardisées de manière à réaliser des études comparatives inter-laboratoires. Ces derniers ont accès à la banque de données par Internet. Chaque laboratoire s'engage à rentrer les profils génétiques des souches isolées de cas cliniques ou autres. Ainsi, la banque de données s'enrichit et permet une bonne réactivité des services de la santé en cas d'épidémie.

Actuellement, il n'existe pas à notre connaissance un tel réseau de surveillance en France. Est-il envisageable de mettre en place un tel réseau ?

Toutefois, de plus en plus de souches bactériennes et notamment de *L. monocytogenes* sont passées en champs pulsés à l'AFSSA ou dans d'autres laboratoires afin de constituer des banques de données interfilières.

Page 27, En productions laitières

140 souches de *L. monocytogenes* ont été collectées dans la zone AOC Camembert au lait cru de Normandie. La caractérisation phénotypique (sérotype et lysotype) et génotypique a permis de mettre en évidence une grande diversité (programme ONILAIT avec le concours de l'ASEPT). Le comportement de *Listeria monocytogenes* dans le lait est souche, température et type de lait (cru ou pasteurisé) -dépendant, résultats obtenus avec 6 souches différentes d'origine laitière et la souche Scott A. A titre d'exemple, seulement 2 souches sauvages sont capables de se multiplier dans du lait pasteurisé maintenu à 3°C pendant 65 h et la croissance d'aucune souche n'est observée dans le lait cru. Pour les températures permettant la croissance, le développement de *L. monocytogenes* est 2 fois plus rapide dans le lait pasteurisé que dans le lait cru. La croissance des souches est également plus rapide dans les camemberts au lait pasteurisé. Contrairement aux souches sauvages, la croissance de la souche Scott A est sensiblement identique sur ces 2 types de lait. L'effet inhibiteur du lait cru a été corrélé à la présence de lactobacilles thermophiles, de levures et à la présence de lactoferrine, lactopéroxydase et de thiocyanate.

Programme ONILAIT : Amélioration de la qualité sanitaire des fromages AOC par la caractérisation des laits crus et l'étude du comportement de *Listeria monocytogenes* en fabrication (Mars 1999).

Page 29, § 125

L'effet inhibiteur du système lactoperoxydase (LPS) est souche-dépendant (rapport ONILAIT 1999). L'efficacité inhibitrice du LPS dépend de la concentration de ses composants, selon les concentrations utilisées, un effet bactériostatique ou bactéricide peut-être obtenu. L'inhibition de *L. monocytogenes* dans le lait en présence du LPS est d'autant plus importante que le pH est acide. L'efficacité inhibitrice du LPS peut être augmentée en substituant le pseudohalogénure SCN⁻ par les halogénures I⁻ ou IO₃⁻ (Boussouel, 1998). Le système lactopéroxydase associé à la nisine (bactériocine) induit un effet bactéricide sans reprise de croissance dans le lait (Boussouel *et al.*, 1999).

Boussouel, N. 1998. Le système Lactoperoxydasique (LPS) : caractérisation, amélioration de son efficacité antibactérienne et recherche de combinaisons LPS-Nisine à activité anti-*Listeria monocytogenes*. Thèse INPL Nancy.

Boussouel N, Mathieu F, Benoit V, Linder M, Revol-Junelles AM, Milliere, JB. Response surface methodology, an approach to predict the effects of a lactoperoxydase system, Nisin, alone or in combination, on *Listeria monocytogenes* in skim milk. J. Appl. Microbiol. 1999 86(4): 642-52.

Programme ONILAIT : Amélioration de la qualité sanitaire des fromages AOC par la caractérisation des laits crus et l'étude du comportement de *Listeria monocytogenes* en fabrication (Mars 1999).

Page 30, § 134

La fréquence de contamination des poissons fumés varie de 0 à 50% selon l'origine géographique du poisson. Le niveau de contamination varie en fonction de l'origine (sauvage ou élevage), de la saison, de la technique de pêche, de la manipulation des poissons et du mode de conservation (réfrigération, congélation). Dans les ateliers de transformation, la source de contamination la plus importante est la surface de la peau et les viscères du poisson. Le matériel et le personnel est décrit comme une source secondaire. Certaines pratiques de fabrication favorisent la contamination du saumon fumé à froid (Duffes, 1999 ; programme FAIR). - Duffes, F. 1999. Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. Trends in Food Science and Technology. 10 : 211-216. - Spoilage and Safety of Cold-Smoked Fish. FAIR Project CT 95-1207. Topic 2, Contamination of cold-smoked fish with *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* (Task 2C, Efficacy of sanitation and *Listeria*.) - Gay M. (1999) Contamination ways of cold-smoked fish with *Listeria monocytogenes*. IAMFES Bearborn - USA, août 1999

Questions n°16, 17 et 18

Effet du milieu environnant

L'effet de l'adsorption de différentes protéines de lait a été bien étudié sur les surfaces. L'adhésion de cellules de *Listeria monocytogenes* est tantôt favorisée tantôt diminuée selon les protéines considérées (Helke *et al.*, 1993, Al-Makhlafi *et al.*, 1994).

Effet du pH

Chez *Listeria monocytogenes*, l'adhésion est diminuée aux pH alcalins (pH 9), mais aux pH acides (jusqu'à 4) les cellules adhèrent sensiblement de la même façon qu'en condition neutre (Smoot et Pierson, 1998a,b).

Effet de la température

Selon Smoot et Pierson (1998a), le nombre de cellules de *Listeria monocytogenes* adhérentes augmente avec l'augmentation de la température entre 10 et 45°C. La température influence également de façon importante la force d'adhésion des cellules aux surfaces, mais pas le pH. D'autres auteurs, ont montré que indépendamment de la mobilité cellulaire, il semble que les flagelles de *Listeria monocytogenes*, agissent comme une structure adhésive impliquée dans les premières étapes de l'adhésion (Vatanyoopaisarn *et al.*, 2000). Or les conditions de température régnant dans l'environnement des ateliers de production sont le plus souvent inférieures à 25°C. Dans ces conditions *L. monocytogenes* est sous forme flagellée, ce qui favoriserait donc l'adhésion.

Interactions microbiennes

Jeong et Frank (1994) ont démontré la capacité de croissance de *Listeria monocytogenes* à 10°C au sein de biofilms, même en présence de flore compétitive isolée d'ateliers de production carnés ou laitiers. *L. monocytogenes* se développe plus lentement en présence de la flore compétitive mais ne disparaît jamais du biofilm où elle se maintient dans une proportion de 1% de la population totale.

D'autre part, indépendamment du taux de croissance, des souches très adhésives peuvent promouvoir l'adhésion de souches qui le sont peu. Ainsi, l'adhésion de *Listeria monocytogenes* est favorisée en présence de *Pseudomonas fragi* (Sasahara et Zottola, 1993). Il en est de même pour *Listeria innocua* en présence de *Pseudomonas aeruginosa* (Bourion et Cerf, 1996).

Résistance aux désinfectants

L'action des désinfectants sur *Listeria monocytogenes* en biofilm ou adhérentes a fait l'objet de nombreuses études, démontrant la résistance accrue des bactéries colonisant les surfaces (Arizcun *et al.*, 1999, Assanta *et al.*, 1990, 1996, Best *et al.*, 1990, Fatemi et Frank, 1999, Frank et Koffi, 1990, Krysinski *et al.*, 1992, Lee et Frank, 1991, Maris, 1992, Mosteller et Bishop, 1993, Mustapha et Liewen, 1989, Reistano *et al.*, 1994, Ren et Frank, 1993, Ronner et Wong, 1993, Roy *et al.*, 1993, Somers *et al.*, 1994, Wirtanen et Mattila-Sandholm, 1992a,b).

AL-MAKHLAFI, H., MCGUIRE, J. & DAESCHEL, M., 1994. Influence of preadsorbed milk proteins on adhesion of *Listeria monocytogenes* to hydrophobic and hydrophilic silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 460(10), 3560-3565.

SMOOT, L.M. & PIERSON, M.D.-1998b. Influence of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 61 (10), 1293-1298.

SOMERS, E.B., SCHOEMI, J.L. & WONG, A.C.L.-1994. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 22, 269-276.

VATANYOOPAISARN, S., NAZLI, A., DODD, C.E.R., REES, C.E.D. & WAITES, W.M., 2000. Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2), 860-863

WIRTANEN, G. & MATTILA-SANDHOLM, T., 1992a. Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests. part I. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 25 (1), 43-49.

WIRTANEN, G. & MATTILA-SANDHOLM, T., 1992b. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. part II. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technology*, 25 (1), 50-54.

Page 39, § 184

Les voies d'entrées de *Listeria monocytogenes* dans le cas de listérioses cutanées mériteraient d'être développées (intégrité de l'épiderme, etc.) Par ailleurs aucune référence bibliographique n'est mentionnée à ce sujet.

Page 50, § 238

Existe t-il une explications au pic du troisième trimestre ? N'existe t-il pas en plus de ce pic, une augmentation des cas de listérioses au premier trimestre (janvier en particulier) dans les pays développés, France notamment, correspondant aux fêtes de fin d'année ?

Page 62 : CATEGORIES D'ALIMENTS ET LISTERIA MONOCYTOGENES

La classification des aliments par rapport au risque *Listeria monocytogenes* est différente selon les pays. Voici des exemples de nomenclatures venant de l'Allemagne, du Canada, de la France, de l'Angleterre et du

Danemark. Pour une meilleure lecture des tableaux, la succession des classes n'est pas en rapport avec l'augmentation du risque *Listeria monocytogenes*.

Approche allemande (Bartelt et al. 1999)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments ayant fait l'objet d'un traitement qui assure la destruction de <i>L. monocytogenes</i> . Pas de recontamination possible
II	Aliments qui peuvent être contaminés par <i>L. monocytogenes</i> , mais qui ne permettent pas sa croissance.
III	Aliments qui peuvent être contaminés par <i>L. monocytogenes</i> et qui permettent sa croissance.
IV	Aliments, autres que ceux prêts à l'emploi, ayant fait l'objet d'un traitement thermique avant consommation.

Approche canadienne (Farber et al. 1996)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments ayant été impliqués dans des épidémies de listériose
II	Aliments avec une DLC > 10 jours, permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i>
III	Aliments avec une DLC < 10 jours, permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i>
IV	Aliments ne permettant pas la croissance de <i>L. monocytogenes</i>

Ce tableau est présent page 62, § 294 sous forme de texte. - Farber, J.M., and Hartwig, J. (1996) The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*, 7:253-258

Approche française (DGAI)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
A	Aliments spécialement destinés à la consommation de population à risque (aliments pour nourrissons, aliments spéciaux à usage médical etc.)
B	Aliments ayant fait l'objet d'un traitement assainissant dans leur conditionnement définitif ou conditionnés après traitement
C1	Produits crus ou ayant subi un traitement insuffisant pour les assainir à l'exception des produits à base de lait, qu'ils soient consommés crus ou après cuisson
C2	Produits crus ayant subi un traitement assainissant puis manipulés pour le conditionnement à l'exception des produits à base de lait
C3	Produits à base de lait autres que ceux visés aux points A et B

Approche anglaise (Campden & Chorleywood Research Association)

Catégorie	Niveau du risque	Nature des produits alimentaires
A	Risque faible	Aliments qui ne seront plus transformés par le fabricant
B	Risque faible	Aliments qui pourront être traités ou lavés par le fabricant ou par le consommateur
C1	Risque élevé	Aliments qui ne seront pas traités par le consommateur. Aliments conservés et/ou protégés de façon à réduire la croissance de pathogènes
C2	Risque élevé	Aliments qui sont supposés ne pas être traités par le consommateur. Aliments susceptibles de permettre la croissance de pathogènes

Approche danoise (Nørrung *et al.* 1999)

Catégorie	Nature des produits alimentaires
I	Aliments traités thermiquement dans leur emballage définitif
II	Aliments manipulés après traitement thermique. Aliments qui permettent la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie (généralement inférieure à une semaine)
III	Aliments prêts à l'emploi, avec peu d'agents conservateurs et non traités thermiquement. Aliments permettant la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie (généralement inférieure à trois semaines)
IV	Aliments traités thermiquement et manipulés après traitement. Aliments stabilisés vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie. Les aliments, avec une durée de vie inférieure à une semaine, sont considérés comme stables.
V	Aliments prêts à l'emploi, avec peu d'agents conservateurs et non traités thermiquement. Aliments stabilisés vis-à-vis de la croissance de <i>L. monocytogenes</i> pendant leur durée de vie. Les aliments, avec une durée de vie inférieure à trois semaines, sont considérés comme stables.
VI	Aliments crus, aliments prêts à l'emploi.

- Nørrung, B., J.K. Andersen, and J. Schlundt (1999): Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int. J. Food Microbiology* Dec 15;53(2-3):195- 203.

Page 78 : BIBLIOGRAPHIE

Une référence importante ne semble pas être présente et peut contribuer au débat notamment au niveau européen.

- European Commission. Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*, 23 September 1999, 47 pages.

Partie non traitée dans le rapport intermédiaire**Rôle des épices comme inhibiteurs naturels de *L. monocytogenes***

Les plantes sont bien connues pour leur activité antimicrobienne. Les agents anti-microbiens sont les phytoalexines, isothiocyanates, allícines, pigments et les composés phénoliques des herbes ou épices. Beuchat (1994) a listé 60 plantes qui sont couramment utilisées comme herbes ou épices présentant des activités antimicrobiennes. Les acides, présents dans les plantes, sont utilisés comme conservateurs (acides benzoïque, sorbique, acétique et citrique). Il a été démontré que le romarin inhibait la croissance de *L. monocytogenes* (Pandit *et al.*, 1994). Les piments et l'eugénol ont inhibé *L. monocytogenes* et *Aeromonas hydrophila* dans la viande de poulet préparée (Hao *et al.*, 1998).

Hao *et al.* (1998). Efficacy of plant extracts in inhibiting *Aeromonas hydrophila* and *L. monocytogenes* in refrigerated cooked poultry. *Food Microbiol.* 15: 367-378.

Pandit VA et Shelef LA (1994). Sensitivity of *L. monocytogenes* to rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) *Food Microbiol.* 11: 57-63.

Beuchat LR and Golden DA (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 43: 134-142. »

• Contribution du groupe microbiologie et évaluation des risques du Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France (Compte Rendu de la réunion du 8 juin 2000)

« L'Agence française de sécurité sanitaire des aliments a été saisie le 2 juillet 1999 par les ministères chargés de la Santé, de l'Agriculture et de la Consommation, d'une demande de réactualisation du risque sanitaire lié à *Listeria monocytogenes*.

Pour répondre à cette demande, une Commission spécifique d'étude, instituée au sein de l'Afssa, a élaboré un document intermédiaire rassemblant les connaissances scientifiques dans ce domaine. En avril 2000, l'Afssa a rendu public ce document pour que soient pris en compte des avis extérieurs. Dans cet esprit, le groupe « Microbiologie et évaluation des risques » du Conseil supérieur d'hygiène publique de France s'est réuni le 7 juin 2000 afin de faire part de ses remarques à la Commission.

A. REMARQUES GENERALES

Le groupe « Microbiologie et évaluation des risques » reconnaît le travail considérable qu'a nécessité la rédaction de ce document intermédiaire qui répond à un certain nombre de questions concernant *Listeria monocytogenes* et la listériose.

Cependant, le groupe d'experts regrette que :

- la forme du document ne soit pas conforme à la démarche recommandée par le *Codex Alimentarius* pour l'appréciation des risques,
- la Commission, lors de sa réflexion initiale, n'ait pas bénéficié de la participation des industriels ; ceci aurait permis en particulier, un apport de connaissances supplémentaires et actualisées sur *Listeria monocytogenes*.

Par ailleurs, le groupe suggère que :

- le titre du rapport devienne: « Actualisation des connaissances concernant *Listeria monocytogenes* et listériose » ; sinon, l'introduction devrait clairement souligner qu'il ne s'agit pas d'une analyse de risque construite suivant le modèle du *Codex Alimentarius*,
- le rapport fasse la distinction entre les connaissances scientifiques issues de la littérature et les suggestions propres à la Commission,
- les travaux français soient d'avantage mis en valeur (références bibliographiques supplémentaires, par exemple),
- la Commission poursuive ses travaux en élargissant sa composition à d'autres experts de l'appréciation des risques. L'appréciation ainsi produite permettrait de faire une suggestion d'options de gestion des risques et de les hiérarchiser sous la forme d'un document utilisable au niveau national et international.

B REMARQUES PARTICULIERES

Des remarques ont été faites par le groupe sur les différentes sections structurant le rapport de la commission.

SECTION	REMARQUES DU GROUPE
Lettre de Martin HIRSCH	Cette partie souligne de nombreux points importants mais le lien avec le corps du rapport n'est pas clair. Les options de gestion des risques auraient pu être hiérarchisées.
A : Physiologie de Lm*	Des questions ne sont pas traitées : - effet des nitrites et nitrates sur Lm, - influence de la température sur la physiologie des différentes souches de Lm (cf Begot et al., 1998 cité dans les références bibliographiques). Q5 : la température n'est pas mentionnée dans le titre. §19 : la diversité des souches vis à vis de la thermorésistance n'est pas décrite. §24 : ce paragraphe non spécifique à Lm pourrait être supprimé.
B : Isolement et identification de Lm	Q10 : l'expression « génétique moléculaire » pourrait être remplacée par « biologie moléculaire » §48 : « <i>L. monocytogenes</i> » doit être remplacé par « <i>L. innocua</i> » §85 : contrairement à ce qui est dit dans ce paragraphe, l'inhibition de la PCR par une matrice alimentaire est parfois un problème non résolu.
C : Ecologie de Lm	Les données des tableaux sont tirées de références bibliographiques très hétérogènes en terme de date, lieu, etc ; ce qui ne facilite pas leur interprétation.

SECTION	REMARQUES DU GROUPE
	<p>Le tableau V ne permet pas de distinguer les données issues de l'élevage et de l'abattage.</p> <p>L'origine « sol » pour Lm ne ressort pas suffisamment dans ce chapitre.</p> <p>§100 : les données sur les températures (chambres froides, réfrigérateurs) ne sont pas suffisamment précises (pays ?, périodes ?, type de vitrines ?).</p> <p>§112 : attention à la compréhension de ce paragraphe par le lecteur!</p>
D : Pathologie humaine	<p>La sensibilité aux antibiotiques de souches de Lm isolées d'aliments, n'est pas décrite.</p> <p>§143 : il pourrait être précisé que les symptômes de la listériose sont susceptibles d'être confondus avec ceux de la grippe.</p>
E : Pathologie animale	
F : Physiopathologie de la maladie	<p>Si pour la gestion des risques liés à Lm, toute souche de Lm doit être considérée comme pathogène, d'un point de vue scientifique, ce caractère doit être discuté.</p> <p>Q30 : des expériences sur cobayes traités aux anti-acides pourraient être mentionnées</p> <p>Q36 : aucune donnée n'est mentionnée concernant l'hétérogénéité de la virulence de Lm. De nombreux modèles expérimentaux (<i>in vivo</i>, sur cultures cellulaires, embryons de poulet) ont été publiés pour étudier cet aspect .</p>
G : Relation dose-réponse	<p>Ce chapitre est un point clef dans la démarche d'appréciation du risque ; aussi, le manque de connaissance sur ce sujet aurait pu être souligné. Néanmoins, ce chapitre aurait pu être complété par d'autres travaux (cf références bibliographiques)</p> <p>§228 : le groupe «Microbiologie » estime que la présentation des travaux de Buchanan et al (1997) est à revoir.</p>
H : Epidémiologie	<p>Le portage aurait pu être détaillé en particulier sur les points suivants :</p> <p>les animaux porteurs sont une source importante de contamination ;</p> <p>les animaux porteurs sont-ils de simples vecteurs ou des facteurs d'amplification de Lm ?</p> <p>Le tableau XVII, ne mentionne que des valeurs moyennes de consommation, de contamination, ou d'exposition. Il faudrait prendre en compte des données plus précises, notamment en terme de consommation (catégories de la population consommant plus que d'autres) et de contamination (données détenues par les industriels).</p> <p>§ 246 à 251 : ces paragraphes, non spécifiques à Lm , pourraient être supprimés.</p>
I : Règlements actuels et classement des aliments	<p>Ce paragraphe représente un intérêt pour apprécier les risques. Cependant il doit être utilisé avec précaution car les données réglementaires sont susceptibles d'évoluer.</p>
J : Microbiologie prévisionnelle	<p>Ce chapitre occupe une place trop importante dans le rapport. Il pourrait être rééquilibré tout en tenant compte des autres modèles notamment anglais et américains.</p>
K : Appréciation du risque	<p>Il faudrait faire référence aux paragraphes 231-233 pour les réseaux de surveillance.</p> <p>Les sources françaises d'estimation des cas annuels de listériose aurait pu être citées.</p>

Lm : *Listeria monocytogenes*

§ : paragraphe

Q :question »

- Contribution du laboratoire d'épidémiologie et d'analyse des risque de l'Ecole NationaleVétérinaire d'Alfort

« Introduction

Nous tenons pour commencer à saluer le travail qu'a demandé ce rapport préliminaire. Celui-ci apporte de nombreuses informations au lecteur francophone, et l'intérêt de la lettre d'accompagnement est évident. Le présent commentaire répond au souhait d'échange exprimé par le président de la commission devant le Groupe de microbiologie de la Section de l'alimentation et de la nutrition du Conseil supérieur d'hygiène publique de France. Il est destiné à compléter l'information déjà contenue dans le rapport préliminaire, et à en discuter de façon constructive certains aspects.

Commentaire sur le titre et l'objet du rapport

La lettre de mission demande de fournir :

1. « l'ensemble des éléments d'évaluation du risque permettant [aux trois ministères de tutelle de l'AFSSA] d'adapter leur protocole de gestion »
2. « une actualisation de différentes données disponibles en matière de listériose ».

Le titre du rapport condense tout cela en : « Une actualisation de l'évaluation du risque lié à *L. monocytogenes* ».

Un problème pour le lecteur est que les auteurs n'indiquent pas le sens qu'ils donnent au mot évaluation :

- s'agit-il du premier composant de l'analyse des risques, c'est-à-dire une description du risque de façon qualitative et/ou quantitative si les données sont disponibles (« risk assessment », traduit de préférence par « appréciation du risque »¹) ? Apparemment non, ou pas uniquement, puisque il y a un chapitre « Appréciation du risque » qui représente 5% du rapport. Ce chapitre montre que l'appréciation du risque de listériose liée à l'ensemble des aliments n'a pas encore été faite en France. Il n'y a donc pas d'appréciation susceptible d'être actualisée.
- s'agit-il de la première étape de la *gestion* du risque, deuxième composant de l'analyse des risques² ? Cette première étape est un jugement de valeur sur le caractère acceptable du risque, jugement de valeur qui précède et conditionne la décision d'entreprendre où non la gestion du risque. L'ambiguïté ici provient de ce que, au sein de l'AFSSA, certains professent publiquement que ce jugement de valeur relève des personnes chargées de l'appréciation du risque.

Quant à « l'actualisation de différentes données disponibles en matière de listériose », c'est manifestement l'essentiel du document que nous commentons ci-dessous.

Commentaire sur la composition de la Commission

« Afin de garantir son indépendance, la Commission a travaillé sans ouverture au monde industriel » (page 9). Cette phrase est inquiétante, et pourrait conduire à un blocage. Le monde industriel peut légitimement en déduire qu'on le suspecte de n'avoir pas le souci de la santé publique. Il peut avoir l'impression que son apport scientifique, technique et technologique, et sa connaissance du tissu économique, sont considérées comme dépourvus de valeur. Plus généralement, la Commission peut donner prise à la critique suivante : avoir refusé de considérer l'expertise comme une activité faisant intervenir des avis potentiellement divergents.

Par ailleurs la commission semble composée majoritairement, sinon exclusivement de médecins et de microbiologistes. La commission a-t-elle consulté ou fait appel à des personnes ayant des compétences sur les sujets suivants : techniques agricoles (ensilages), technologie des produits à risque (fromages, charcuterie), appréciation quantitative des risques ?

Commentaire général sur le contenu

¹ Anonyme (1998). Glossaire hygiène des aliments, XP V 01-002 (décembre 1998), AFNOR : Paris la Défense

² Anonymous (1997). "Joint FAO/WHO expert consultation on the application of risk management to food safety matters". FAO, Rome.

Il existe de bons ouvrages récents sur *L. monocytogenes*³. On s'attendait à ce que le rapport y ajoute des compléments, afin de fournir l'actualisation demandée et d'attirer l'attention sur les particularités de la situation française s'il y en a. Or le rapport reprend l'ensemble des questions à la base. Par ailleurs, comme il est (semble-t-il) la compilation des travaux indépendants des membres de la Commission, il est hétérogène. A plusieurs reprises, lorsqu'il est deux fois question du même sujet, les auteurs correspondants soit ne font pas appel à la même bibliographie, soit en tirent des conclusions dissemblables. Des exemples sont donnés plus bas.

Commentaires sur des points particuliers

L'ensilage (questions 12 et 13, page 23)

Certes, les ensilages mal faits peuvent contenir *L. monocytogenes* en concentration élevée (page 23). Mais :

- lorsque c'est le cas alors que l'hygiène de l'élevage et de la traite est convenable, on n'en décèle pas dans le lait ;
- la plupart des ensilages sont bien faits et ne contiennent pas de *L. monocytogenes*
- d'autres aliments des animaux contiennent des *L. monocytogenes*.

Par conséquent, les questions importantes sont : quelle est la proportion d'aliments des animaux, ensilages compris, contenant des *L. monocytogenes*, quelle y est la distribution de la concentration de cette bactérie, quelle proportion des laits sont contaminés à partir de ces aliments, à quelle concentration ces laits sont-ils contaminés ?

Le chapitre consacré à l'épidémiologie chez l'animal indique, page 57, question 277 : « Certains auteurs n'hésitent pas à écrire que l'utilisation de l'ensilage augmente de 20 à 40 fois le risque de listériose dans un troupeau » en citant Stahl *et al.* (1996) et Sanaa (1994). Or ce dernier, dans son travail de thèse, a bien étudié le rôle des ensilages dans la contamination du lait mais n'a établi aucune relation entre la contamination des ensilages et l'apparition de cas de listériose chez les animaux. Les chiffres « 20 à 40 » correspondent au risque relatif mesurant la relation entre la contamination des bouses et des ensilages d'une part, et la contamination du lait d'autre part. Il y a donc confusion entre listériose animale et contamination du lait par *L. monocytogenes*. Une telle confusion, dans un texte comme celui-ci, ne peut provenir que d'un *lapsus calami* !

La pasteurisation du lait (page 27)

Question 116 : La thermorésistance de *L. monocytogenes* a aussi été étudiée dans la zone de température de la thermisation (voir Lemaire *et al.* (1989) cité plus bas).

Question 117 : « L'efficacité de la pasteurisation peut être variable en fonction de la souche à détruire et du taux initial de contamination de la matière première. » : cette phrase contient une inexactitude. En effet, un traitement léthal est caractérisé par son efficacité $E = t/D$ (où t est la durée du chauffage et D le temps de réduction décimale ou de division par dix de la population microbienne considérée dans les conditions de chauffage étudiées). L'efficacité, qui est aussi le nombre de division par dix de la population microbienne, ne dépend pas de la contamination initiale. En revanche, la contamination finale, pour un traitement donné (donc une efficacité donnée), dépend bien de la contamination initiale.

Roy *et al.* (1993) semblent cités à tort dans ce contexte, leur article, d'après son titre et son résumé, porte sur la désinfection des surfaces.

Dans plusieurs études sur la thermorésistance de *L. monocytogenes*, le dispositif expérimental était critiquable, ce qui a conduit à des conclusions erronées. L'étude la plus complète sur la survie de *L. monocytogenes* dans le lait, après traitement thermique dans le lait, a été faite sur 38 souches isolées de produits laitiers ou de patients (Lemaire, V., Audurier, A. & Cerf, O. (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Annales de recherches vétérinaires* **20**, 493-500). Les résultats indiquent que, suivant les souches, la probabilité de survie à une pasteurisation haute (15 s à 72°C) d'une cellule de *L. monocytogenes* est de 10^{-10} à 10^{-750} .. La pasteurisation du lait est donc très efficace vis-à-vis de *L. monocytogenes*.

Notons que la vitesse des échanges thermiques est grande lors de la pasteurisation en écoulement continu. De ce fait, les cellules de *L. monocytogenes* n'ont pas le temps de s'adapter et d'acquérir une thermorésistance plus élevée qu'à l'état non stressé. Dans ces conditions, est-il justifié d'écrire (nous soulignons le mot que nous contestons) : « La pasteurisation recommandée à l'heure actuelle est de 72°C pendant 15 secondes et est suffisante pour les laits modérément contaminés » ?

³ par exemple "Listeria, listeriosis, and food safety" (Food Science and Technology, Vol 92), E. T. Ryser & E. H. Marth, 2ème édition révisée, (1999) Marcel Dekker ; ISBN: 0824702352.

En revanche, le rapport souligne à juste titre que l'on ne peut pas balayer d'un revers de main l'hypothèse d'une adaptation lors d'un chauffage progressif, tel qu'on en pratique pour la fabrication des plats cuisinés préparés à l'avance (5^{ème} gamme, « sous-vide »). Heureusement, les barèmes de pasteurisation ont une valeur pasteurisatrice VP_{70} telle que, si le phénomène existe, il ne peut se traduire par la survie d'une concentration significative de *L. monocytogenes* (Duesne, A. (1994). « Conséquences du stress bactérien sur les traitements thermiques à appliquer aux produits pasteurisés ». Mémoire de stage de l'École technique de la conservation, réalisé au Laboratoire de génie des procédés alimentaires, INRA, Massy).

Les fromages (page 28)

Questions 121 à 125 : l'évolution de la concentration de *L. monocytogenes* dans les fromages de type camembert est complexe. Les travaux (non cités) de :

Ryser, A. T. & Marth, E. H. (1987). Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese. *Journal of Food Protection* **50**, 372-378.

montrent l'évolution suivante : forte réduction dans les premières heures de la fabrication ; augmentation de la concentration au cours de l'affinage de telle sorte qu'à 30 jours, la concentration ne dépasse pas le niveau qu'elle avait dans le caillé.

Végétaux transformés (page 29)

Question 128 : les résultats de Gras, M.-H., Druet-Michaud, C. & Cerf, O. (1994). La flore bactérienne des feuilles de salade. *Sciences des aliments* **14**, 173-188, cités dans la bibliographie de la question 91 (page 23), vont dans le même sens que ceux mentionnés dans le paragraphe 128. Cet article confirme également la faible efficacité de la chloration pour désinfecter les feuilles de salades. L'explication proposée, illustrée par des photographies au microscope à balayage, est que la flore microbienne forme des biofilms sur la surface des feuilles et dans les stomates. Les biofilms protégeraient les cellules de *L. monocytogenes* contre l'agression du chlore.

Biofilms (page 30)

Dans les questions 135 à 140, les publications suivantes ne sont pas citées. Elles apportent des éclairages intéressants sur les questions traitées :

Arizcun, C., Vasseur, C. & Labadie, J.-C. (1998). Effect of several decontamination procedures on *Listeria monocytogenes* growing in biofilms. *Journal of Food Protection* **61**, 731-734.

Briandet, R., Leriche, V., Carpentier, B. & Bellon-Fontaine, M.-N. (1999). Effects of the growth procedure on the surface hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* cells on their adhesion to stainless steel. *Journal of Food Protection* **62**, 994-998.

Leriche, V. & Carpentier, B. (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *Journal of Applied Microbiology* **88**, 594-605.

Leriche, V., Chassaing, D. & Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nisin-producing strain of *Lactococcus lactis*. *International Journal of Food Microbiology* **51**, 169-182.

Pathologie animale (page 35)

La question 168 indique une évolution endémique possible dans certains élevages : l'étude de Sanaa (1993) - dont le maître d'œuvre était l'Institut de l'élevage a duré - au total 3 ans, et pendant cette période, aucun cas de listériose animale n'a été observé sur un effectif de plus de 200 élevages malgré le fait que dans certains élevages l'ensilage était fortement contaminés.

Courbe dose-réponse (pages 46-48)

Cette section (questions 222 à 228) est franchement incomplète, car elle ne cite ni le travail suivant (pourtant cité dans un autre chapitre, page 75) :

Farber, J. M., Ross, W. H. & Harwig, J. (1996). Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 145-156.

ni :

Haas, C. N. (1983). Estimation of risk due to low doses of microorganisms: A comparison of alternative methodologies. *American Journal of Epidemiology* **118**, 573-582

Haas, C. N. (1998). A quantitative risk assessment model for *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, Abstr. Pg. 28, ILSI Symposium Series, Trends and Perspectives in Microbial Food Safety, IAMFES Annual Meeting, Nashville (Tennessee).

Le problème de la courbe dose-réponse est de nouveau discuté page 76, de façon encore plus brève. Le ou les auteurs de cette section pourront utilement s'appuyer sur le chapitre 9 de Haas, C.N., Rose, J.B. & Gerba C.P. (1999). "Quantitative microbial risk assessment". John Wiley & Sons: New York, qu'ils connaissent sûrement déjà.

Probabilité d'exposition (page 55)

Les tableaux XVII à XIX présentent des fréquences d'exposition par personne et par an, qui sont calculées en multipliant la fréquence de contamination par la fréquence de consommation. Cette approche déterministe discutable peut être à l'origine d'une mauvaise estimation du risque.

Dans la réalité, il y a des gens rarement exposés, et ce à des doses faibles, d'autres souvent exposés, et ce à des doses fortes. En outre tous les cas intermédiaires existent, parmi lesquels le cas moyen présenté dans les tableaux. Ce qui importe pour la gestion du risque est lié aux conséquences chez les individus exposés souvent à des doses fortes, puisque c'est dans cette catégorie de la population que survient l'essentiel des cas. L'approche suivie dans le rapport néglige ces derniers, et donc conduit à une *sous-estimation du risque*.

Un moyen pour améliorer l'estimation est de faire une modélisation de la distribution des expositions en utilisant la méthode de Monte Carlo. Mais pour cela il faut connaître les distributions à la fois des concentrations de *L. monocytogenes* dans les aliments, et la distribution des consommations de ces derniers. Le rapport ferait œuvre utile en insistant là-dessus, car l'erreur commise par le ou les auteurs des tableaux est malheureusement très répandue.

Microbiologie prévisionnelle (pages 64-73)

Cette section (questions 303 à 350) est centrée sur la modélisation mathématique. Elle détaille essentiellement les aspects liés à l'approche française. Celle-ci est-elle exclusive d'autres approches ? Si les méthodes anglo-saxonnes de modélisation sont critiquables aux yeux des auteurs de ce chapitre, il n'est cependant pas impossible que les approches étrangères parviennent à des prévisions de qualité convenable. Par ailleurs il est dommageable à nos yeux que cette section ne fasse pas de place aux aspects suivants :

- l'influence de l'état physiologique des bactéries (stress ou absence de stress),
- l'influence de la température de pré-incubation,
- l'influence de la taille de l'inoculum,
- l'influence de flores microbiennes susceptible de produire des substances inhibitrices ou d'entrer en compétition avec *L. monocytogenes*.

Les publications suivantes apportent des informations dans les trois premiers domaines ci-dessus et comportent une bibliographie complémentaire :

Gay, M., Cerf, O. & Davey, K. R. (1996). Influence of pre-incubation temperature and inoculum concentration on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* at 14°C. *Journal of Applied Bacteriology* **81**, 433-438.

Gay, M. & Cerf, O. (1997). Significance of temperature and preincubation temperature on survival of *Listeria monocytogenes* at pH 4.8. *Letters in Applied Microbiology* **25**, 1-4.

Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.-C. & Lebert A. (1998). Effects of pH or a(w) stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **42**, 71-77.

Augustin, J.C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L. & Carlier, V. (2000). Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1706-1710.

Appréciation du risque (pages 74-77)

Plusieurs travaux sur ce sujet ne sont pas cités dans les questions 351 à 367. En voici une liste :

- Bemrah, N., Sanaa, M., Cassin, M. H., Griffiths, M. W. and Cerf, O. (1998). Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine* **37**, 129-45 : cet article reprend de façon beaucoup plus poussée le travail de Bemrah & Sanaa (1997) cité dans le rapport. Il examine plusieurs options de gestion du risque, en se basant sur une étude de sensibilité du modèle, et met

en évidence l'effet crucial quoique non intuitif d'un des facteurs de risque, l'excrétion de *L. monocytogenes* dans le lait de vache porteuses asymptomatiques.

- Cassin, M. H., Cerf, O., Sanaa, M. and Lammerding, A. M. (1998). Quantitative risk assessment modelling: example of raw milk cheese. *In* International Dairy Congress ed. Aarhus (Denmark): 21-24 September (The Danish Dairy Board, Frederiks Allé 22, DK-8000 Aarhus C, Danemark, tél.: +45 87 31 20 00, Fax.: +45 87 31 20 01, E-mail: ddb@mejeri.dk) : alors que dans l'article précédent, la distinction entre l'incertitude et la variabilité n'est pas faite, cet article-ci est centré sur l'étude de l'influence de l'incertitude provenant de cinq sources différentes. Il met en évidence les points où il est essentiel de faire un effort pour la collecte de données.
- Un travail collectif de grande ampleur sur l'appréciation du risque lié à *L. monocytogenes* est en cours aux États-Unis. Un rapport préliminaire disponible depuis le 13 mai 1999 à l'adresse <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/listrisk.html> donne une bibliographie importante, et expose la méthodologie qui sera suivie : Structure and Initial Data Survey for the Risk Assessment of the Public Health Impact of Foodborne *Listeria monocytogenes*, Prepared by the *Listeria monocytogenes* Risk Assessment Team led by Richard C. Whiting and Wesley Long.

Les paragraphes 253 à 268 (pages 52 à 55) apportent des éléments pour l'appréciation quantitative du risque ; ne faudrait-il pas les faire figurer dans le chapitre consacré à cette dernière ?

Lien entre la lettre d'accompagnement et le rapport

En général, le lien entre la lettre d'accompagnement et le rapport n'est pas apparent. De quelle façon l'auteur de la lettre d'accompagnement s'est-il appuyé sur le contenu du rapport pour arriver aux recommandations pour la gestion ?

Commentaire général sur la lettre

Les auteurs du rapport ont-ils fait ou ont-ils l'intention de faire une ou des appréciations quantitatives du risque les conduisant mesurer les conséquences de telle option de gestion plutôt que de telle autre ? L'avantage de cette démarche serait qu'ils pourraient suggérer à l'auteur de la lettre une hiérarchie, un ordre de priorité des actions possibles. En effet, dans sa rédaction actuelle, la lettre d'accompagnement énumère de nombreuses options de gestion, mais n'indique pas par lesquelles commencer, ni celles qui sont essentielles ou celles qui sont moins importantes, etc.

Commentaires sur des points particuliers de la lettre

Page 6 : la déclaration obligatoire des cas de listériose *épidémiques* peut aussi être faite aux Services vétérinaires.

Page 8 : oui, l'épandage des déchets organiques est en effet un facteur de risque mal ou non étudié. Un rapport au Secrétaire d'État à la recherche intitulé Modification de la « pression de contamination » dans l'environnement (O. Cerf et P. Pardon) le soulignait déjà en 1996.

Page 8 : « S'il n'est pas aujourd'hui possible de faire le lien exact entre ces facteurs de contamination initiale et les contaminations observées dans les produits finis alimentaires, une analyse des épisodes épidémiques met en évidence, dans plusieurs cas, l'existence d'une source excrétrice à partir d'un ou plusieurs animaux d'élevage d'où étaient issus la matière première utilisée pour la denrée en cause ». Oui, et ceci démontre la puissance de l'approche épidémiologique. L'appréciation quantitative des risques de listériose liée à la consommation de fromages à pâte molle au lait cru (cf *supra* Bemrah *et al.* 1998) le confirme. En effet, l'article cité montre que :

- lorsque les fromages contiennent de fortes contaminations, celles-ci sont causées par le lait des vaches excrétrant dans leur lait des cellules de *L. monocytogenes* ;
- la contamination de base des fromages (le bruit de fond) provient des contaminations du lait lors de la traite et de la collecte. Son niveau et sa fréquence sont quasiment indépendants de la présence ou non de vaches excrétrices de *L. monocytogenes*.

Comme ce sont les fortes contaminations des denrées alimentaires (les doses élevées) qui provoquent la plus fortes probabilités de listériose, la priorité de la gestion du risque est – dans ce cas particulier – la détection rapide et le retrait des vaches excrétrices.

Page 12 : la notion de dose infectieuse minimale est controversée. Soit il existe un seuil en dessous duquel la dose ne provoque jamais la maladie, soit il n'en existe pas. C'est la deuxième hypothèse qui est retenue par les auteurs des publications mentionnées plus haut dans le paragraphe intitulé « Courbe dose-réponse ». Cependant, dans ce deuxième cas, il reste possible de définir, non pas un seuil minimal d'infection mais un

seuil en dessous duquel la réponse (la probabilité d'infection) est jugé *acceptable* : c'est le rôle de la puissance publique responsable de la gestion du risque de définir ce seuil, et cela pourrait être indiqué. En l'absence de cette information, il n'est pas possible de fixer la dose correspondante si l'on se refuse de prendre une responsabilité en matière de gestion du risque.

Page 15 : « Il est à cet égard souhaitable que soit établi un équivalent de guide de bonnes pratiques pour les tests de vieillissement » ». Qui.. Un tel guide existe sous la référence : AFNOR XP V01-003 (décembre 1998) Hygiène et sécurité des produits alimentaires - Lignes directrices pour l'élaboration d'un protocole de validation de la durée de vie microbiologique - Denrées périssables, réfrigérées. Ce guide est cité, et critiqué, page 107. De fait, le guide s'applique bien lorsque les micro-organismes dont la croissance est étudiée sont présents à des concentrations faciles à mesurer, par exemple > 10 UFC par gramme. Il s'applique mal lorsque les concentrations à étudier sont < 1 UFC par prise d'essai. Il s'applique donc mal lorsque la durée de vie de la denrée alimentaire doit être fixée en fonction de *L. monocytogenes*. A l'heure actuelle, il n'a pas été trouvé de solution à ce problème pratique. On doit donc continuer soit de pratiquer des essais avec contamination volontaire (« challenge test »), soit de faire appel à la microbiologie prévisionnelle. Or aucune de ces approches n'est complètement satisfaisante :

- l'état physiologique d'un inoculum préparé en vue d'une contamination volontaire n'est pas celui d'une contamination naturelle ;
- la taille de l'inoculum peut avoir une influence sur la latence et la vitesse de croissance ;
- la microbiologie prévisionnelle ne s'applique pas encore à tous les aliments, notamment elle s'applique mal à ceux qui contiennent une flore microbienne abondante (fromages, charcuterie, etc.) ;
- la microbiologie prévisionnelle ne prend pas encore en compte la variabilité de *lag* et de μ , et apporte une réponse déterministe alors qu'il faudrait utiliser une approche statistique (la simulation de Monte Carlo s'appliquerait particulièrement bien ici).

Vous remerciant pour l'attention que vous aurez prêtée à ce qui précède, nous vous prions d'accepter, Monsieur, l'expression de nos salutations distinguées »

- Contribution de l'Institut de l'Élevage

« Voici quelques remarques sur le rapport intermédiaire de la commission *Listeria* de l'AFSSA, au nom de l'Institut de l'Élevage (Institut technique de recherche appliquée et de développement sur l'élevage des ruminants).

Tout ou partie de ces remarques seront par ailleurs reprises dans une note plus complète qui doit vous être adressée très prochainement par le CNIEL (Organe de l'interprofession laitière).

SECTION C : Ecologie de *L.monocytogenes*

Page 23

- En introduction de cette section, avant la question 12, il serait utile de rappeler que *L.monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire, d'origine tellurique et pouvant être présente en quantité importante dans le sol et dans l'eau. En effet, la contamination des végétaux, décrite par la suite, n'est pas seulement liée aux épandages ou aux déjections animales. Indépendamment de ces facteurs favorisant, la terre peut être un vecteur de contamination très important, ce qui a des conséquences pratiques dont il faut tenir compte.

- Question 13 - paragraphe 92 : La technique de l'ensilage est aujourd'hui développée y compris dans les exploitations non intensives. Pour l'ensilage, le maïs n'est pas récolté "à des stades très divers de végétation".

- Question 13 - paragraphe 93 : Le pH 3 n'est qu'exceptionnellement atteint ; il vaudrait mieux employer les formulations suivantes : une fermentation lactique qui doit normalement abaisser le pH au dessous de 4 (valeurs variables selon la nature des végétaux ensilés) - Fin de paragraphe : (pH inférieur à 4).

- Question 13 - paragraphe 95 : Il faudrait supprimer la phrase entre parenthèse sur les silos "taupes", qui sont souvent confectionnés sur des plates formes bétonnées et peuvent donc être compatibles avec un ensilage sain. Plus généralement, le vrai problème n'est pas le type de silo, mais la qualité de confection de l'ensilage.

Page 25

- Question 15 : Le titre est ambigu, qui englobe dans la même notion de "milieux industriels", l'élevage de porcs ou de volailles, la production du lait (qu'on ne peut vraiment pas qualifier d'industrielle), les productions maraîchères, les fruits de mer et poissons, et enfin la transformation des viandes et des produits laitiers. Une formulation de type "Que sait-on de l'écologie de *L.monocytogenes* dans les différentes filières alimentaires ?" paraîtrait plus adéquate.

Page 27

- paragraphe 113 : Les fréquences indiquées dans le tableau VII, sans aucun commentaire, peuvent conduire à des interprétations totalement erronées tant en terme de valeurs absolues que de comparaison. On ne sait rien des différents protocoles d'échantillonnage, de leur représentativité et du niveau auquel ils ont été prélevés (exploitations laitières, laits de collecte entrant à l'usine, ou autre ...). C'est très regrettable, car les différences importantes entre les fréquences mentionnées sont probablement plus liées à des différences de protocole d'échantillonnage qu'à des différences d'incidence.

- paragraphe 114 : Cette hypothèse n'est pas confirmée par les études françaises (Sanaa *et al*, 1993; Zundel *et al*, 1999) ni par l'expérience de terrain.

- paragraphe 115 : ce paragraphe, qui est le seul à évoquer l'origine de la contamination du lait cru, est très ambigu : il laisse entendre que cette contamination serait avant tout liée à celle "du lait de certains animaux seulement", et donc aurait pour origine le portage et l'excrétion mammaire. Cela est faux : dans la majorité des cas, la contamination du lait cru est liée à l'environnement et à un défaut d'hygiène lors des opérations de traite, totalement indépendamment d'un quelconque effet "animal". La variabilité de cette contamination est donc principalement due à celle des conditions générales d'hygiène dans les exploitations françaises (Sanaa *et al*, 1993; Zundel *et al*, 1999). Cela est très important à souligner, notamment dans la perspective des solutions de maîtrise : le dépistage et l'élimination des animaux excréteurs par la voie mammaire sont évidemment indispensables, mais totalement insuffisants.

Plus généralement, pour la filière lait comme pour les autres d'ailleurs, il n'y a pas de chapitre consacré aux facteurs de la contamination des produits (matière première ou produits transformés). Or il y a beaucoup de travaux sur ces facteurs, y compris dans la littérature scientifique à laquelle ce rapport se réfère. C'est très regrettable, car c'est bien sur la base de la connaissance de ces facteurs que peut s'envisager la maîtrise des risques liés à *L.monocytogenes*.

Page 29

Paragraphe 125 : La référence relative à la multiplication préférentielle dans les croûtes de fromages (Sanaa et Ménard, 1994) est inexacte : ces auteurs n'ont pas travaillé sur ce sujet, et doivent citer une autre publication ...

SECTION E : Pathologie animale

Page 36

Paragraphe 174 : La présentation du tableau IX prête à confusion, ou est incomplète : chez les bovins, ovins et caprins, la forme la plus fréquente de l'infection est le portage sain, qui se traduit par une excrétion fécale de *L.monocytogenes*. C'est important car c'est bien là qu'est le problème pour les filières concernées : ce portage est très difficile à dépister, et il est le principal responsable de la contamination de l'environnement des exploitations d'élevage, et donc des matières premières (lait, viande) qui en sortent.

SECTION H : Epidémiologie

Page 56

- Paragraphe 270 : "... les recherches peuvent être faites à la demande d'un Groupement de Défense Sanitaire ou d'une entreprise (il n'y a pas que le secteur coopératif qui fait ce genre de demande ...), laitière le plus souvent, dans le cadre d'une campagne de dépistage systématiqueou de portages asymptomatiques (dans un cheptel laitier particulier, par exemple). Il faudrait ajouter ici le dépistage qui s'opère par le biais des plans systématiques de surveillance et de contrôle des laits collectés par les entreprises fabriquant des produits au lait cru, qui conduisent, en cas de contrôles positifs, à des investigations dans les élevages concernés pour identifier et prévenir les causes de contamination.

- Paragraphe 271 Tableau XX : Les fréquences indiquées sont trompeuses, car les bovins sont les animaux les plus contrôlés, mais pas forcément les plus touchés ...Cela devrait être indiqué en commentaire.

Page 57

- Paragraphe 277 : La pratique du stockage et de la conservation des végétaux destinés à l'alimentation animale, notamment pour les ruminants n'est pas de plus en plus courante ! Elle a toujours existé (foin) et c'est une obligation : comment nourrir ces animaux en hiver ...?

Les références sont citées de façon erronée : les résultats des études en question ne portent pas sur la quantification des facteurs du risque de listériose dans le troupeau, mais sur celui de la contamination du lait dans les exploitations. D'autre part, ce n'est pas l'utilisation des ensilages qui est associée à une multiplication de ce risque par 20 à (40 ?), mais la contamination effective des ensilages et des fèces des animaux.

- Paragraphe 278 : Cette affirmation mériterait d'être vérifiée, en tous cas pour ce qui concerne les ruminants : sauf erreur de notre part, on ne dispose pas de références sur les facteurs qui interviennent sur l'apparition des formes cliniques de la listériose, et sur le rôle de l'état physiologique des animaux.

Page 58

- paragraphe 286 : les taux de portage et d'excrétion mammaire cités paraissent excessivement élevés, notamment s'il s'agit de fréquences d'animaux excréteurs dans un même troupeau. Il faut préciser les chiffres qui se rapportent à cette fréquence, et ceux qui concernent la fréquence des résultats positifs sur des contrôles successifs du lait d'un même animal. En ce qui concerne les bovins, on n'observe jamais plus d'un ou deux animaux excréteurs par la voie mammaire dans un même troupeau, et pour l'ensemble des troupeaux, ce type de portage est très peu fréquent.

Plus généralement, Il ne faudrait pas laisser entendre que la contamination du lait cru est essentiellement liée à ce type de portage, ce qui est totalement inexact (cf; remarque relative au paragraphe 115). »

- Contribution de l'Interprofession Laitière (CNIEL)

« Le rapport intermédiaire représente une compilation de connaissances rassemblées par chacun des experts participants, dans les domaines qui sont les leurs. On constate qu'aucun expert des questions ne concernant ni la contamination du lait à l'amont (ENVA, INRA Nouzilly, Institut d'Elevage ...), ni la thermorésistance (ENVA) n'a participé aux travaux de la Commission.

Nous regrettons par ailleurs que les professionnels n'aient pas été associés, d'autant plus que de nombreuses études citées dans le rapport ont été initiées et pilotées en collaboration avec leurs experts et avec leurs concours financier.

Le choix d'une rédaction en forme de "questions-réponses" apporte, dans l'état actuel du pré-rapport, des informations rédigées selon l'approche de chaque auteur. Cela entraîne des répétitions et parfois des incohérences. Il serait souhaitable d'inclure une synthèse générale dans le rapport définitif.

Vous trouverez ci-joint les commentaires de l'interprofession laitière (CNIEL).

SECTION A : PHYSIOLOGIE DE *L.MONOCYTOGENES*

P. 14 / 19 : Thermorésistance : *Listeria monocytogenes* n'est pas considérée comme un germe thermorésistant mais il existe une grande variabilité de sensibilité à la chaleur entre les différentes souches. On peut cependant considérer que, globalement, un chauffage à 60°C pendant 2 mn réduit d'un facteur 10 la population initiale (LEMAIRE et al 1989) : travaux conduits en collaboration avec l'interprofession laitière.

P. 15 / 23 : Le terme "détruire" n'est pas adapté. Une dose absorbée entraîne un certain nombre de réductions décimales et non une destruction de la population. Dans le cas visé, avec 0,5 kGy de dose de réduction décimale, la dose de 2 kGy entraîne une baisse de 4 log. La destruction ou non de la population sera liée à la concentration initiale de l'échantillon en *L.monocytogenes*.

P. 16 / 33 : "De très nombreuses interactionsMoll et al. 1999"

Parmi les bactériocines, la nisine est la plus anciennement connue et son efficacité prouvée dans les fromages (RICHARD 1996). Ce même auteur et ses collaborateurs ont également démontré, dans le cadre d'études conduites avec l'interprofession laitière (SISWANTO et al 1996) l'effet de substances antagonistes vis-à-vis des *Listeria monocytogenes* de molécules du type des linenscines, produites par des bactéries du genre *Brevibacterium*.

LEMAIRE, V; AUDURIER, A and CERF O (1989). Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. Annales de recherches vétérinaires 20 493-500.

SISWANTO, HP; GRATADOUX J, J; RICHARD, J (1996).

Potentiel inhibiteur de la souche de *Brevibacterium linens* productrice de la linenscine 0C2 vis-à-vis de *Listeria* et de *Staphylococcus aureus*. Le lait 76 501-512.

SECTION B : ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE *L.MONOCYTOGENES*

P. 17 / tableau IV : Il est souhaitable d'ajouter une date au tableau des méthodes validées par l'AFNOR, car il est susceptible d'évoluer dans le temps.

SECTION C : ECOLOGIE DE *L.MONOCYTOGENES*

P. 23 / Ecologie : En introduction de cette section, avant la question 12, il serait utile de rappeler que *L.monocytogenes* est une bactérie ubiquitaire, d'origine tellurique et pouvant être présente en quantité importante dans le sol et dans l'eau. En effet, la contamination des végétaux, décrite par la suite, n'est pas

seulement liée aux épandages ou aux déjections animales. Indépendamment de ces facteurs favorisant, la terre peut être un vecteur de contamination, ce qui a des conséquences pratiques dont il faut tenir compte.

P. 23 / 92 : La technique de l'ensilage est aujourd'hui développée y compris dans les exploitations non intensives. Pour l'ensilage, le maïs n'est pas récolté "à des stades très divers de végétation".

P. 23 / 93 : Le pH 3 n'est qu'exceptionnellement atteint ; il vaudrait mieux employer les formulations suivantes : une fermentation lactique qui doit normalement abaisser le pH au dessous de 4 (valeurs variables selon la nature des végétaux ensilés) - Fin de paragraphe :

(pH inférieur à 4).

P. 23 / 95 : Il faudrait supprimer la phrase entre parenthèse sur les silos "taupes", qui sont souvent confectionnés sur des plates formes bétonnées et peuvent donc être compatibles avec un ensilage sain. Plus généralement, le vrai problème n'est pas le type de silo, mais la qualité de confection de l'ensilage.

P. 25 / Question 15 : Le titre est ambigu, qui englobe dans la même notion de "milieux industriels" l'élevage de porcs ou de volailles, la production du lait (qu'on ne peut vraiment pas qualifier d'industrielle), les productions maraîchères, les fruits de mer et poissons, et enfin la transformation des viandes et des produits laitiers. Une formulation de type "Que sait-on de l'écologie de *L.monocytogenes* dans les différentes filières alimentaires ?" paraîtrait plus adéquate.

P. 27 / 113 : Les fréquences indiquées dans le tableau VII, sans aucun commentaire, peuvent conduire à des interprétations totalement erronées tant en terme de valeurs absolues que de comparaison. On ne sait rien des différents protocoles d'échantillonnage, de leur représentativité et du niveau auquel ils ont été prélevés (exploitations laitières, laits de collecte entrant à l'usine, ou autre ...). C'est très regrettable, car les différences importantes entre les fréquences mentionnées sont probablement plus liées à des différences de protocole d'échantillonnage qu'à des différences d'incidence.

P. 27 / 114 : Cette hypothèse n'est pas confirmée par les études françaises (Sanaa *et al*, 1993; Zundel *et al*, 1999) ni par l'expérience de terrain.

P. 27 / 115 : Ce paragraphe évoque l'origine d'une éventuelle contamination du lait cru. Il laisse entendre que cette contamination serait avant tout liée à celle "du lait de certains animaux seulement". En fait, la contamination peut avoir une double origine : les animaux, par excrétion mammaire ou l'environnement (germe tellurique).

Cela est très important à souligner, notamment dans la perspective des solutions de maîtrise : le dépistage et l'élimination des animaux excréteurs par la voie mammaire sont évidemment indispensables, mais doivent être accompagnés par des mesures de maîtrise d'hygiène.

Plus généralement, pour la filière lait comme pour les autres d'ailleurs, il n'y a pas de chapitre consacré aux facteurs de la contamination des produits (matière première ou produits transformés). Or il y a beaucoup de travaux sur ces facteurs, y compris dans la littérature scientifique à laquelle ce rapport se réfère.

P. 28 / 116 : Il sera utile de préciser la température de pasteurisation et d'ajouter à la fin de la première phrase "qui est définie par 72 ° C 15 secondes ou traitement équivalent". Par ailleurs le procédé de thermisation n'est pas "très utilisé". Il est plus adapté d'écrire "ce procédé peut être utilisé".

P. 28 / 117 : Le traitement thermique utilisé dans les industries, s'il s'agit d'une pasteurisation (ou équivalent) est suffisant pour assurer la destruction de *L. monocytogenes*. Cependant, l'efficacité du traitement thermique peut être variable en fonction de la souche à détruire et bien sûr du couple temps/température appliqué. Quoi qu'il en soit, le taux initial de la contamination de la matière première conditionne le taux résiduel. Celui-ci sera bien entendu d'autant plus faible que la contamination initiale est elle-même faible et l'efficacité du traitement thermique élevée, comme l'ont démontré des études conduites à l'initiative de l'interprofession laitière déjà citées (LEMAIRE *et al*. 1989).

P. 28 / 120 : Les observations sur les techniques de nettoyage devraient être traitées avec le paragraphe sur les biofilms, qui illustre les difficultés qui peuvent exister en pratique. Nous proposons d'intégrer la question 16, p. 30 / 135 à 138, dans le paragraphe 120.

Nous proposons également de préciser (ligne 6): "C'est également ce qui ressort de l'étude, menée entre 1996 et 1998 sur un nombre limité de sites de production par KEROUANTON et al (1999), démontrant..."

P. 28 / 121 : Le comportement des *L. monocytogenes* est très variable selon les fromages (LARPENT 1995). C'est essentiellement la technologie de fabrication fromagère qui conditionne ce comportement, compte tenu du chauffage du lait ou du caillé d'une part et des conditions d'affinage d'autre part (durée, évolution du pH et de la température, teneur en sel et activité de l'eau pour ne citer que les principaux paramètres influençant le développement bactérien).

Certains fromages élaborés à partir de laits artificiellement contaminés se révèlent exempts de *L. monocytogenes* après une durée d'affinage suffisante. On peut donc considérer qu'ils possèdent non seulement des propriétés inhibitrices mais même destructrices pour ce germe.

C'est en particulier le cas des fromages à pâtes pressées cuites (travaux conduits par l'interprofession laitière), voire de certains bleus.

Par ailleurs, les fromages frais qui présentent un pH acide, inférieur ou égal à pH 4,5, ne permettent pas la croissance, voire la survie de *L. monocytogenes*. C'est le cas par exemple des fromages à pâte molle lactique comme certains fromages de chèvre. Enfin, d'autres fromages, s'ils sont élaborés à partir de laits contaminés ou s'ils sont accidentellement recontaminés en cours de fabrication autorisent la croissance des *L. monocytogenes*.

Il s'agit d'une façon générale des fromages à pâte molle à croûte fleurie ou lavée, en particulier si leur pH s'élève significativement en cours d'affinage.

P. 29 / 125 : La référence relative à la multiplication préférentielle dans les croûtes de fromages (Sanaa et Ménard, 1994) est inexacte : ces auteurs n'ont pas travaillé sur ce sujet, et doivent citer une autre publication ...

P. 30 / 135 à 138 : Comme souligné ci-dessus, P. 28, il sera utile d'intégrer la question sur les biofilms dans le paragraphe 120 qui parle, entre autre, des techniques de nettoyage.

SECTION D : PATHOLOGIE HUMAINE

P. 33 / 154 : Le portage humain de "5 % de la population" constitue une information importante. Nous serions très intéressés de disposer de la référence bibliographique qui cite ce chiffre.

SECTION E : PATHOLOGIE ANIMALE

P. 36 / 174 : La présentation du tableau IX prête à confusion, ou est incomplète : chez les bovins, ovins et caprins, la forme la plus fréquente de l'infection est le portage sain, qui se traduit par une excrétion fécale de *L. monocytogenes*. C'est important car c'est bien là qu'est le problème pour les filières concernées : ce portage est très difficile à dépister, et il est le principal responsable de la contamination de l'environnement des exploitations d'élevage, et donc des matières premières qui en sortent.

SECTION F : PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE

P. 44 / 211 : Fin de chapitre : il est à noter qu'un important programme de recherche relatif à la virulence de souches de *Listeria monocytogenes* d'origines différentes (animales, épidémiques, de produits alimentaires, d'environnement), vient d'être engagé avec le concours de l'interprofession laitière.

SECTION G : RELATION DOSE - REPONSE

P. 47 / tableau XII :

Ligne 14 du tableau, compléter ainsi :

France 1997	14 fromages à pâte molle	Jacquet et
	"Pont l'Evêque" "Livarot"	al. 1998

SECTION H : EPIDEMIOLOGIE

P. 52 et 53 : Concernant le chapitre "aliments contaminés à la distribution" nous regrettons qu'il n'y ait pas de données plus récentes que celles de 1996.

P. 53 / Tableau XIV, produits laitiers : Il s'agit des fromages au lait pasteurisé et non des fromages pasteurisés.

P. 53 / 257 : "En France, l'investigation ...et de fromage à pâte molle au lait cru dans les épidémies de 1995 ("Brie de Meaux") et de 1997 ("Pont l'Evêque" et "Livarot"). L'épidémie de 1999 liée à un fromage d'"Epoisses" semble avoir été due à un produit qui ne répondait pas aux exigences de l'AOC et dont la nature du lait mis en oeuvre n'a pas été précisée.

P. 53 / tableau XV/ ligne 13 : Compléter comme précédemment pour le tableau XII de la p. 47.

France 1997	14 fromages à pâte molle	Jacquet et al.
	"Pont l'Evêque" et "Livarot"	1998

P. 54 / 261 : Ces résultats, obtenus par une approche épidémiologique, mériteraient d'être confirmés par des études comparatives entre des souches isolées des malades et celles isolées des aliments. Nous sommes très intéressés d'obtenir la référence de la publication complète de l'étude française, afin de connaître en détail la méthodologie choisie.

P. 55 / 268, tableau XVII à XIX : L'approche des estimations sur la probabilité d'exposition de la population française pourrait être très intéressante. Il est néanmoins regrettable qu'on ne dispose pas de données plus récentes que celles de 1996. Par ailleurs il serait instructif de présenter dans le chapitre les tableaux complets qui montrent l'évolution de la listériose humaine en France depuis une dizaine d'années (BEH).

P. 56 / 274 : Nous sommes très intéressés de connaître les références bibliographiques des travaux dont les conclusions sont citées dans ce paragraphe.

P. 56 / 270 : "... les recherches peuvent être faites à la demande d'un Groupement de Défense Sanitaire ou d'une entreprise (il n'y a pas que le secteur coopératif qui fait ce genre de demande ...), laitière le plus souvent, dans le cadre d'une campagne de dépistage systématiqueou de portages asymptomatiques (dans un cheptel laitier particulier, par exemple). Il faudrait ajouter ici le dépistage qui s'opère par le biais des plans systématiques de surveillance et de contrôle des laits collectés par les entreprises fabriquant des produits au lait cru, qui conduisent, en cas de contrôles positifs, à des investigations dans les élevages concernés pour identifier et prévenir les causes de contamination.

P. 56 / 271 / Tableau XX : Les fréquences indiquées sont trompeuses, car les bovins sont les animaux les plus contrôlés, mais pas forcément les plus touchés ...Cela devrait être indiqué en commentaire.

P. 57 / 277 : La pratique du stockage et de la conservation des végétaux destinés à l'alimentation animale, notamment pour les ruminants n'est pas de plus en plus courante ! Elle a toujours existé (foin) et c'est une obligation : comment nourrir ces animaux en hiver ...?

Les références sont citées de façon erronée : les résultats des études en question ne portent pas sur la quantification des facteurs du risque de listériose dans le troupeau, mais sur celui de la contamination du lait

dans les exploitations. D'autre part, ce n'est pas l'utilisation des ensilages qui est associée à une multiplication du risque par 20 ou (40 ?), mais leur contamination associée à celle des bouses.

P. 57 / 278 : Cette affirmation mériterait d'être vérifiée, en tous cas pour ce qui concerne les ruminants : sauf erreur de notre part, on ne dispose pas de références sur les facteurs qui interviennent sur l'apparition des formes cliniques de la listériose, et sur le rôle de l'état physiologique des animaux.

P. 57 / 279 : Les fluctuations saisonnières de l'incidence de la listériose animale pourraient être liées à plusieurs facteurs, comme l'époque des vélages ou à la contamination du lait par l'environnement en saison de pluie. A notre connaissance, des travaux cités de Menard et Sanaa n'ont pas porté sur l'apparition des listérioses cliniques.

P. 57 / 282 : Le terme « sous – produits » pour les AOC fromagères ne semblent pas adaptés et l'ensilage n'est interdit que dans certaines AOC.

P. 57 / 283 : Le paragraphe sur la listériose animale montre qu'il existe une "surveillance sanitaire attentive afin de préciser l'origine des signes nerveux". Ces affirmations devraient être intégrées dans la formulation du paragraphe 270 / page 56.

P. 58 / 286 : les taux de portage et d'excrétion mammaire cités paraissent excessivement élevés, notamment s'il s'agit de fréquences d'animaux excréteurs dans un même troupeau. Il faut préciser les chiffres qui se rapportent à cette fréquence, et ceux qui concernent la fréquence des résultats positifs sur des contrôles successifs du lait d'un même animal. En ce qui concerne les bovins, on n'observe jamais plus d'un ou deux animaux excréteurs par la voie mammaire dans un même troupeau, et pour l'ensemble des troupeaux, ce type de portage est très peu fréquent.

SECTION I : REGLEMENTS ACTUELS ET CLASSEMENTS DES ALIMENTS

p 62 et 63 / Question n° 45 et annexe 2 : Comment déterminer des durées de conservation des produits ?

Dans l'introduction , il est mentionné que ce rapport intermédiaire constitue une base documentaire mais n'est pas accompagné de conclusions. Cette partie semble toutefois orientée, par une critique de la norme Afnor et la mise en avant de la microbiologie prévisionnelle et challenges tests.

La norme expérimentale Afnor n'a pas pour but de proposer des tests de vieillissement, mais des outils pour permettre à chaque industriel de construire son propre protocole de vieillissement : ainsi, les conditions raisonnablement prévisibles retenues par l'industriel peuvent être très différentes de celles qui figurent dans la norme.

Les études de vieillissement sont à entreprendre dans les entreprises dans des conditions fixées par le fabricant et normalement prévisibles. Cette notion de "conditions raisonnablement prévisibles" est essentielle : elle doit tenir compte des paramètres réels de commercialisation et de la responsabilisation effective de chaque maillon de la chaîne. Des considérations abusivement exagérées (consommateur ou distributeur) ne doivent pas être prise en compte. Le fabricant informe le consommateur via l'étiquetage. Ce dernier doit apprendre à lire les étiquettes et son rôle, à ce niveau ne doit pas être minimisé. De façon générale, le rôle du consommateur, en bout de chaîne, nous paraît grandement occulté dans ce rapport. Il en est de même pour d'autres parties de la chaîne (transport et distribution).

Au point 301, il est mentionné qu'une bonne connaissance de la contamination initiale est impérative pour garantir que la DLC est réaliste et reproductible, occulte l'ensemble des règles de maîtrise de l'hygiène appliquées par les professionnels.

Une contamination au départ doit être considérée comme un accident. Dans ce cas, les challenges tests ou la microbiologie prédictive sont des outils qui doivent alors permettre d'évaluer le comportement des *Listeria monocytogenes* dans les produits et pour les fabricants de gérer au mieux ces accidents.

P. 74 / Question 59 : « Densité de *L.monocytogenes* dans le lait de vache pasteurisé » Le titre et la rédaction du paragraphe laissent penser que le lait pasteurisé est un vecteur de *L. monocytogenes*, ce qui ne correspond pas à la réalité. Il sera utile de préciser qu'il s'agit d'une théorie basée sur une modélisation et de changer le titre en « Etudes de modélisation », car le résultat cité ne répond pas à la question de l'exposition.

P. 107 et 108 : les remarques conclusives ne semblent pas être en lien avec le contenu du rapport. La notion de filière dès l'alimentation animale jusqu'au consommateur final a une très grande importance dans le maintien de la qualité hygiénique des aliments. Tous les acteurs, le consommateur inclus, doivent être responsabilisés. »

- Contribution de la Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs et Transformateurs de Viande (FICT)

« Comme suite à la publication du rapport intermédiaire de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes* de l'AFSSA (avril 2000). Compte tenu de votre souhait de voir le public et les professionnels enrichir le document, La Fédération Française des Industriels Charcutiers, Traiteurs et Transformateurs de Viande (FICT) souhaite apporter les contributions suivantes :

p 8 .

Il est troublant que l'expertise industrielle ait été exclue des travaux de la Commission, alors que c'est elle qui, aujourd'hui assure la définition de la durabilité des produits (Directive 2000/13/CE relative au rapprochement des législations des états membres concernant l'étiquetage et la présentation des denrées alimentaires ainsi que la publicité faite à leur égard). Pour les produits à base de viande la réglementation (dernier tirt de l'art 7 de l'arrêté du 22 janvier 1993 relatif aux conditions hygiénique et sanitaires de production, de mise sur le marché et d'échanges de produits à base de viande) confirme que le système d'autocontrôle est "mis à la disposition" de l'autorité de tutelle, qui n'a pas explicitement autorité à valider (ni par conséquent à cautionner) le système de surveillance du fabricant.

p 13 .

Ne serait-il pas judicieux de montrer les disparités de μ max des différentes souches de *L.m.* au lieu de se limiter à deux souches ?

p 27

Le point 112 n'a pas à figurer à cet endroit . C'est une affirmation d'ordre plus général,

p 49

Il serait souhaitable que :les systèmes d'épidémiologie, les systèmes de déclaration des listérioses les nombres de cas dans les États membres et les principaux pays développés (USA, Canada, Japon) soient comparés de manière plus approfondie.

p 61

La différenciation entre les catégories C2 et C3 est justifiée par le fait que les produits de la catégorie C3 est constitué de produits pour lesquels la date étiquetée est une DLUO et non une DLC (cf point 297).

p 62

Le tableau XXII nous semble une base de réflexion satisfaisante du fait qu'il prend en compte le point 290.

p. 70 et 72

Les challenges test sont des outils expérimentaux pour mieux connaître l'évolution d'une souche (en tenant compte de ses différentes caractéristiques y compris son état physiologique) sur un produit et dans des conditions particulières. Cet outil permet par exemple d'appréhender l'efficacité d'une modification de formulation, de procédé de fabrication ou d'une mesure préventive dans le cadre d'une démarche HACCP. Il ne peut pas être utilisé pour établir une durée de vie sanitaire.

Simulations (p. 72 et 103)

Le rapport dans sa partie relative à l'évolution de *Listeria monocytogenes* dans les produits alimentaires n'est basé sur aucune donnée analytique mais sur un ensemble de données issues de simulations informatique du développement de *Listeria monocytogenes* sur un produit modèle pour lequel aucune précision n'est donnée quand aux caractéristiques physico-chimiques du modèle ce qui ne nous permet pas de le situer par rapport aux produits mis sur le marché (pH, aw, composition, ...).

De plus, il n'est fait référence à aucune données analytiques qui permettraient de vérifier la solidité des modélisations réalisées.

Le scénario qui a été choisi pour les simulations nous semble, contrairement à ce qui est dit dans le rapport, totalement irréaliste pour les raisons suivantes : l'augmentation de la température du produit de 4°C à 17°C correspond selon nos données à une rupture de chaîne du froid pendant une durée de l'ordre de 2 à 3 heures,

Parmi les niveaux de contamination initiales qui ont été prises, seules 1 Lm/25g et 1 Lm/100g nous semblent devoir être prises en compte, on compte 25 ruptures chaîne du froid pendant la conservation du produit chez le consommateur, aucune précision n'est apportée sur la détermination de ce paramètre qui nous paraît très surévalué.

Nous avons évalué, en fonction de données fournies par les fabricants (cinétique d'élévation de la température dans les produits maintenus à température ambiante, taille des conditionnements, taille des portions) qu'une évaluation réaliste, consisterait à choisir au maximum 10 ruptures de chaînes du froid liées à la consommation du produit, la température du produit ne dépassant pas 10°C (sortie du réfrigérateur du produit d'environ 1heure) .

p 103

Le titre de l'annexe 2 n'est pas conforme à son contenu puisqu'il y est précisé "en aucun cas elles ne sont des simulations destinées à être utilisées pour fixer la DLC". Ce titre est à adapté à son contenu.

p107.

Il n'a jamais existé accord entre les fabricants et les distributeurs sur une DLC de 45 jours. La DLC est fixée par le fabricant en tenant compte des conditions raisonnablement prévisibles de conservation de son produit. Les DLC des rillettes sont très inférieures aux 45 jours annoncés.

p.107

La DLC n'est pas conditionnée par la bactérie, le produit et le scénario de vie, les conditions de fabrication d'un produit peuvent améliorer (à produit fini constant) une DLC.

p108.

Il faut supprimer l'alinéa 2 de la page 108. C'est la vocation des industries agroalimentaires de revisiter recettes et procédés pour ajuster à des objectifs "volontaristes " de DLC. Vouloir les interdire méconnaît une exigence de base du marché.

Il ne faut pas évoquer à l'alinéa 5 une perspective éventuelle de fixation de DLC plus courte que la DLC potentielle , car cela contrevient au droit communautaire qui laisse au conditionneur la liberté mais aussi la responsabilité de définir lui même la durabilité de son produit.

Le dernier alinéa est insuffisamment volontariste. On ne peut pas demander à toutes les IAA de réduire leur DLC au seul motif que le scénario " réaliste " envisagé par ce rapport " intermédiaire prévoit au moins 21 ruptures de la chaîne du froid..

La définition des conditions raisonnablement prévisibles est là aussi à l'initiative des entreprises qui mettent en marché. Depuis plusieurs années les scénarios plausibles sont respectivement : 2 premiers tiers de la DLC à 4°C, tiers résiduel à 8°C ou premier tiers à 4°C et deux tiers résiduels à 8°C.

Nous partons du principe que les consommateurs qui achètent un produit assujéti à conservation sous régime de froid disposent d'un réfrigérateur (et non d'un garde manger à la température du balcon et de la cave) et qu'ils dimensionnent la masse unitaire de leur achat pour envisager une consommation dans les deux à 5 jours après ouverture et en tous cas évitent d'exposer leurs produits plusieurs dizaines de fois à température ambiante.

Bibliographie,

Le rapport n'a pas tenu compte de certains travaux scientifiques récents et adaptés puisque traitant du comportement de *Listeria monocytogenes* dans les charcuteries. En effet, des travaux ont été effectués à l'initiative de la FICT par l'ENV Alfort (HIDAOA) et le CTSCCV. Ils ont été publiés :

Heat resistance of Lm : D- and Z-values in Ham (Carlier, Augustin, Rozier - J. of food protection, Vol 59, N°6, 1996, pages 588-591),

Destruction of Lm during a Ham Cooking Process (Carlier, Augustin, Rozier - J. of food protection, Vol 59, N°6, pages 592-595),

Mathematical modelling of the heat resistance of Lm (Carlier, Augustin, Rozier - J. of applied microbiology, 1998, 84, 185-191).

Souhaitant vivement que nos remarques enrichissent le travail de la Commission d'étude des risques liés à *Listeria monocytogenes* de l'A.F.S.S.A »

- Contribution de l'Académie Vétérinaire de France (remarques intermédiaires)

« 1 Environnement des élevages

Clé de la contamination animale, l'importance de la contamination de l'environnement des élevages doit être considérée avec beaucoup d'attention.

Souvent associée à un manque de rigueur dans la mise en pratique des méthodes modernes d'élevage (économies abusives de main d'œuvre, non respect des règles d'hygiène fondamentale, surépandage, végétaux fermentés contaminés) ce niveau de contamination ne peut-être maîtrisé que par une réflexion et des actions pluridisciplinaires associant tous les partenaires de l'élevage, dans des approches aussi bien fondamentales qu'appliquées.

2 Epidémiologie animale

L'importance quantitative des listérioses animales est sous estimée. Et ce, aussi bien dans leurs formes cliniques que sub-cliniques.

La proposition d'une surveillance centralisée apparaît comme tout à fait opportune. Pour être totalement efficace, cette surveillance devrait s'appuyer :

- * sur la prise en compte du risque listérien dans les schémas de suivis épidémiologiques mis en place dans les élevages laitiers et à viande, dans les productions avicoles et à propos des produits de la pêche ;

- * sur le soutien et le renforcement de la démarche des organismes qui assurent le contrôle de la production laitière ou le contrôle des viandes utilisées en charcuterie industrielle ;

- * et, enfin, sur l'établissement de statistiques rigoureuses à propos des causes de mortalité du bétail.

Pour palier l'absence de cet indispensable outil statistique, il serait judicieux de soumettre, de façon permanente ou périodique, tous les cadavres d'animaux mort de maladie (au moins dans certaines espèces et dans des régions délimitées), à une autopsie obligatoire et subventionnée dont les résultats peuvent seuls constituer le support technique et légal à la formalité de déclaration obligatoire.

La démarche diagnostique devrait s'appuyer, par ailleurs, sur une amélioration de la fiabilité des examens microbiologiques par la standardisation des méthodes de mise en évidence de *Listeria m.*

3 Microbiologie de *Listeria monocytogenes*

Les insuffisances constatées dans la connaissance approfondie de la microbiologie de *Listeria m.* sont soulignées de façon pertinente dans le rapport.

Il est donc proposé qu'un soutien vigoureux soit apporté au développement des recherches, fondamentales ou appliquées, concernant les facteurs de virulence de ce germe ainsi que les conditions de son évolution, soit au sein des denrées (m. prévisionnelle) soit dans les environnements agricoles ou industriels (écologie microbienne).

4 Actions de prévention pour les industries de transformation

Les propositions relatives à l'abord des normes de tolérances par un classement préalable des produits en fonction de leur aptitude au développement de *L.m.* constitue une démarche tout à fait judicieuse.

Il en est de même pour la proposition de standardiser les méthodes d'étude du vieillissement des produits afin d'établir des DLC fiables.

en matière d'hygiène des productions industrielles les manquements et erreurs, souvent constatés lors de la mise en pratique de la méthode H.A.C.C.P., fondement actuel des mesures de prévention, induisent un risque qui doit être souligné. Cette situation résulte, pour l'essentiel, de l'absence de contrôle de la compétence des organismes, privés ou publics, qui diffusent cette approche. Une certification de ces organismes serait pour le moins souhaitable.

D'autre part il est recommandé de concrétiser par des mesures réglementaires les éléments cités de la prévention du danger listérien dans les industries de transformation, à savoir : le concept de produits à seuil, la standardisation des méthodes d'étude du vieillissement des produits et le contrôle de compétence des organismes formateurs à la méthode H.A.C.C.P.

5 Information

Si l'information du public relève des professionnelles de la santé, il est suggéré que des moyens adéquats soient mis en place dans les secteurs agro-vétérinaires afin qu'une véritable mobilisation des producteurs soit réalisée à propos de la pratique quotidienne de l'hygiène fondamentale en élevage.

Cette action de sensibilisation pourrait être conduite à la faveur des « audits d'élevage » prévus par les GDS et les GTV dans les cadres des mesures d'épidémiosurveillance.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1	Représentation en racine carrée de la relation $\sqrt{\mu_{\max}}$ - température pour <i>E. coli</i> et <i>L. monocytogenes</i> CIP 7831. La droite en trait plein est celle attendue pour les bactéries classiques ; les droites en pointillés mettent en évidence une cassure de pente à T_c pour <i>L. monocytogenes</i>	13
Figure 2	Evolution annuelle du nombre de bactériémies et de méningites à <i>Listeria monocytogenes</i> (Source : réseau EPIBAC, Anonymous 1999a).....	54
Figure 3	Ajustement du modèle dynamique [1] sur des données de <i>L. monocytogenes</i> dans des produits laitiers (d'après Rosso <i>et al.</i> 1996). Les valeurs moyennes des estimations du temps de latence <i>lag</i> et du temps de génération ($tg = \ln 2 / \mu_{\max}$), aux 2 températures sont portées sur le graphique.	69
Figure 4	Ajustement du modèle dynamique [1] sur des données de <i>L. monocytogenes</i> dans du saumon fumé (d'après Rosso <i>et al.</i> 1996).	70
Figure 5	Taux de croissance spécifique maximum et intervalles de confiance individuels à 95 % correspondant pour <i>L. monocytogenes</i> CIP 7831 <i>L. monocytogenes</i> Scott A en fonction de la température (Bajard <i>et al.</i> 1996).	71
Figure 6	Relation entre le taux de mortalité et la température de stress. Les intervalles de confiance 95 % ont été calculés par eustachage (sauf à 60°C, 4 points seulement). Le modèle proposé est superposé aux données.	73
Figure 7	Relation entre la latence à la mortalité (<i>lag</i>) et la température de stress (T_s). Les intervalles de confiance 95 % ont été calculés par eustachage (sauf à 60°C, 4 points seulement). Le modèle proposé est superposé aux données.	73
Figure 8	Evolution de $\text{Log}_{10}(\text{UFC/ml})$ quand d_s et T_s varient. La surface théorique correspond au modèle. Les points correspondant aux observations du côté « non sécurité » du modèle et les points pour lesquels la prédiction et l'observation sont égales (à 10 % près) sont notés respectivement (●) (■).....	74
Figure 9	Comparaison d'une simulation et d'une dynamique observée, du développement de <i>L. monocytogenes</i> dans un produit entéral en conditions thermiques variables (d'après Rosso 1995).	75
Figure 10	Simulation par le logiciel ASK_ME de l'effet d'une contamination variant de 1 à 10 <i>L. monocytogenes</i> /100g dans une préparation alimentaire contenant de la viande et pour un profil thermique donné (en haut à gauche).	76

Tableau I Caractères bactériologiques différenciant les espèces de <i>Listeria</i> (+ : positif ; - : négatif) (Rocourt et Jacquet 2000).....	11
Tableau II Caractères différenciant les <i>Listeria</i> de genres bactériens présentant des caractères phénotypiques voisins (d'après Rocourt et Jacquet 2000) (+ : positif ; - : négatif).....	11
Tableau III Taux de croissance maximum (μ_{\max} , h ⁻¹) en fonction de la température (en °C) pour <i>L. monocytogenes</i> CIP 7831 et Scott A. Le modèle de croissance est le modèle exponentiel (la latence n'est pas prise en compte). Les valeurs entre crochets correspondent aux bornes inférieure et supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % (IC95 %).	13
Tableau IV Méthodes de mise en évidence des <i>L. monocytogenes</i> : méthodes normalisées et méthodes validées de détection et de dénombrement (au 01/07/00).....	18
Tableau V Contamination des viandes par <i>L. monocytogenes</i>	27
Tableau VI Contamination des surfaces par <i>L. monocytogenes</i>	28
Tableau VII Incidence de <i>L. monocytogenes</i> dans le lait cru d'après Ryser (1999)	29
Tableau VIII Sensibilité aux antibiotiques selon le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM), novembre 1999. Seuls les antibiotiques dont l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) précise soit explicitement la listériose, soit septicémie ou méningite font l'objet de la publication d'un spectre d'activité (en caractères gras). Les antibiotiques en caractères maigres n'ont pas fait l'objet d'une fixation du spectre par le CASFM.....	36
Tableau IX Espèces animales concernées par l'infection à <i>L. monocytogenes</i>	38
Tableau X Symptômes et fréquence de la listériose animale.....	39
Tableau XI Sensibilité des <i>L. monocytogenes</i> aux antibiotiques utilisés en milieu vétérinaire (Source Laboratoire Départemental d'Analyse des Côtes d'Armor, Laboratoire Départemental d'Analyses et de Recherches de la Haute-Vienne).	40
Tableau XII Épidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays (au 01/07/00).....	50
Tableau XIII Niveau de contamination par produit - Plans de surveillance de la DGCCRF (1993-1996).....	55
Tableau XIV Pourcentage de produits contaminés par <i>L. monocytogenes</i> à la distribution – Plans de surveillance de la DGCCRF (1993-1996).....	56
Tableau XV Épidémies survenues depuis 1980 en France et dans d'autres pays (au 01/07/00)	57
Tableau XVI Aliments mis en cause par les études de type « cas-témoins » sur les facteurs de risque des listérioses sporadiques	58
Tableau XVII Estimation de la fréquence d'exposition à des fromages à pâte molle à croûte fleurie contaminés par <i>L. monocytogenes</i> (> 100/g) dans la population générale. (méthode Hitchins 1995, 1996).....	59
Tableau XVIII Estimation de la fréquence d'exposition à des produits contaminés par <i>L. monocytogenes</i> (> 100 UFC/g) dans la population à risque en France. (méthode Notermans <i>et al.</i> 1998)	59
Tableau XIX Estimation de la fréquence d'exposition à des produits contaminés par <i>L. monocytogenes</i> (> 1000 UFC/g) dans la population à risque en France (méthode Notermans <i>et al.</i> 1998)	59
Tableau XX Cas ou cas-foyers répertoriés de listériose animale (à <i>L. monocytogenes</i>), en France, en 1998 jusqu'au mois de juin 1999 (428 cas-foyers) (Source : Laboratoires Vétérinaires Départementaux d'Analyses)	60
Tableau XXI Inventaire des cas décrits de listérioses animales décrits dans le monde	62
Tableau XXII Classement des aliments et seuils critiques de l'annexe 4 de la note de service DGAI/SDHA/N98/N°8088	65
Tableau XXIII Classement des produits prêts à être consommés et critères proposés (EC - 29/09/99).....	66
Tableau XXIV Exemples de produits (EC - 29/09/99)	66