

UNIVERSITE DE LIMOGES
Faculté de Pharmacie

ANNEE 1991

THESE N°328

**ETUDE DE LA VIRULENCE DE SEROTYPES
DE LISTERIA MONOCYTOGENES
ET D'AUTRES ESPECES DE LISTERIA
DANS L'INFECTION EXPERIMENTALE
CHEZ LA SOURIS**

T H E S E

POUR LE

**DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présentée et soutenue publiquement le 16 Septembre 1991

par

Sylvie CHARLOT
épouse GOVAERT

née le 27 Septembre 1965 à La Rochefoucauld (Charente)

EXAMINATEURS de la THESE

Monsieur le Professeur NICOLAS PRESIDENT
Madame BOSGIRAUD, *Maître de Conférences* JUGE
Monsieur BOTINEAU, *Maître de Conférences* JUGE
Madame RICHON, *Docteur en Médecine* JUGE

1
UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

- DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
- ASSESSEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM (1er Assesseur)
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences (2e Assesseur)

PERSONNEL ENSEIGNANT

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BENEYTOUT Jean-Louis	Biochimie
BERNARD Michel	Physique-Biophysique
BROSSARD Claude	Pharmacotechnie
BUXERAUD Jacques	Chimie Organique, Chimie Thérapeutique
CHULIA Albert	Pharmacognosie
CHULIA Dominique	Pharmacotechnie
DELAGE Christiane	Chimie Générale et Minérale
GALEN François Xavier	Physiologie
GHESTEM Axel	Botanique et Cryptogamie
GUICHARD Claude	Toxicologie
HABRIOUX Gérard	Biochimie Fondamentale
LEFORT des YLOUSES Daniel	Pharmacie Galénique
NICOLAS Jean Albert	Bactériologie et Virologie, Parasitologie
LOUDART Nicole	Pharmacodynamie
PENICAUT Bernard	Chimie Analytique et Bromatologie
RABY Claude	Pharmacie Chimique et Chimie Organique
TIXIER Marie	Biochimie

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

CELS René

A la mémoire de mon père,

A ma mère,

En témoignage de ma profonde affection

A Monsieur le Professeur Jean-Albert NICOLAS
Professeur des Universités de Bactériologie-Virologie-
Parasitologie

Nous vous remercions d'avoir bien voulu nous faire
l'honneur de présider le jury de notre thèse.

Vous nous avez accueillis avec sympathie dans votre
laboratoire et avez mis à notre disposition les moyens
nécessaires à la réalisation de ce travail.

Veillez accepter l'expression de notre profond respect

A Madame Claudine BOSGIRAUD,
Maître de Conférences de Microbiologie

Vous avez suivi avec vigilance l'évolution de ce travail.

Pour la grande disponibilité dont vous avez fait preuve et pour vos précieux conseils, nous vous exprimons tous nos remerciements.

Veillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur Michel BOTINEAU,
Maître de Conférences de Botanique et Cryptogamie

Vous avez très aimablement accepté de faire partie de
notre jury.

Nous vous remercions respectueusement d'avoir bien
voulu juger ce travail.

Nous vous exprimons ici toute notre gratitude.

A Madame Geneviève RICHON
Docteur en Médecine

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous
nous faites en acceptant de juger ce travail.

Nous vous exprimons ici nos sincères
remerciements.

A Alain MENUDIER,

Je te remercie pour l'aide, les conseils, les services
dont tu as su faire preuve.

Sois assuré de toute ma reconnaissance.

PLAN

INTRODUCTION

Première partie : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I- RESERVOIRS

I-1- LE MILIEU EXTERIEUR

I-2- PRODUITS D'ORIGINE ALIMENTAIRE

I-2-1- Lait et produits laitiers

I-2-2- Produits carnés

I-2-3- Les œufs

I-2-4- Autres aliments

I-3- LES ETRES VIVANTS

I-3-1- Les malades

I-3-2- Les porteurs de germes

II- POUVOIR PATHOGENE

II-1- LISTERIOSE HUMAINE

II-1-1- Listeriose fœto-maternelle

II-1-2- Listeriose de l'adulte

II-2- LISTERIOSE ANIMALE

II-2-1- Forme méningoencéphalique

II-2-2- Forme abortive.

II-2-3- Forme septicémique

III- PROTOCOLES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION

III-1- LES METHODES CLASSIQUES D'ISOLEMENT

III-1-1- Recherche de *Listeria* après enrichissement au froid

- III-1-2- Recherche de Listeria selon le protocole FDA
- III-1-3- Recherche de Listeria par le milieu sélectif Oxford
- III-1-4- Recherche de Listeria par l'Agar Selectif Palcam Listeria

- III-2- INDENTIFICATION BIOCHIMIQUE
- III-3- LA SEROTYPIE ET LA LYSOTYPIE
- III-4- MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES ISO-ENZYMES DE
LISTERIA MONOCYTOGENES
- III-5- LES SONDAS
- III-6- LES ANTICORPS MONOCLONAUX
- III-7- LES POLYMERASE-CHAINE REACTIONS (PCR)

IV- VIRULENCE

IV-1- LES FACTEURS EXPRIMANT LE POUVOIR PATHOGENE

- IV-1-1- L'hémolysine
- IV-1-2- Le fer
- IV-1-3- Catalase et superoxyde dismutase
- IV-1-4- "Monocytosis producing activity" - "Immunosuppressive activity"

IV-2- LE MODELE ANIMAL : LA SOURIS

- IV-2-1- Les différentes voies d'inoculation
- IV-2-2- Variation des mécanismes de défense

- IV-2-2-1- L'âge
- IV-2-2-2- Immunocompétence
- IV-2-2-3- Génétique

IV-3- LE MODELE CELLULAIRE

- IV-3-1- Cytotoxicité
- IV-3-2- Entrée et devenir de Listeria dans la cellule

- IV-3-2-1- Mécanismes d'entrée de Listeria monocytogenes dans le corps humain

- IV-3-2-2- Modèle d'infection in vitro d'une lignée cellulaire enterocyte-like cultivée
- IV-3-2-3- Croissance de *Listeria monocytogenes* à l'intérieur des macrophages

Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS

I- INTRODUCTION

II- MATERIEL ET METHODES

- II-1- SOUCHES BACTERIENNES ET PREPARATION DE L'INOCULUM
- II-2- L'HEMOLYSINE
- II-3- INOCULATION DES SOURIS
- II-4- DENOMBREMENT DES BACTERIES DANS LES ORGANES
- II-5- EVALUATION STATISTIQUE

III- RESULTATS

- III-1- HEMOLYSINE
- III-2- MORTALITE DES SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE LISTERIA
- III-3- DETERMINATION DU NOMBRE DE LISTERIA DANS LE LIQUIDE DE LAVAGE PERITONEAL 72 h. APRES L'INJECTION
- III-4- VARIATION DU POIDS DE LA RATE EN FONCTION DE LA SOUCHE INOCULEE
- III-5- DETERMINATION DU NOMBRE DE LISTERIA PAR GRAMME DE FOIE ET DE RATE EN FONCTION DES SOUCHES INOCULEES
- III-6- RECHERCHE DE LISTERIA DANS LES CERVEAUX APRES 24 à 48 h. A 37°C ET 7 JOURS D'INCUBATION à 30°C.

IV- DISCUSSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

Les *Listeria* sont responsables d'infections d'origine alimentaire, qui atteignent préférentiellement la femme enceinte et le nouveau-né ainsi que l'adulte immunodéprimé.

Devant l'importance croissante de ce germe en pathologie humaine ainsi qu'en pathologie animale, de nombreux auteurs ont amélioré les connaissances relatives au pouvoir infectieux et à la virulence des *Listeria*.

Des progrès considérables dans la mise au point des protocoles d'isolement et d'identification ont permis une meilleure approche des différentes espèces et des différents sérotypes de *Listeria*.

Il existe une discordance entre les sérotypes isolés à partir de produits alimentaires et ceux isolés à partir des malades. En effet les sérotypes 1/2a et 1/2c sont fréquemment retrouvés dans les aliments alors qu'en pathologie humaine et animale le sérotype 4b reste dominant.

Ces deux constatations nous ont conduit à rechercher le pouvoir infectieux in-vivo de plusieurs souches sauvages que nous avons isolées au laboratoire.

L'objet de ce travail est la mise en évidence de la relation entre le sérotype et la virulence des souches testées sur la souris Swiss. Les différents paramètres étudiés ont été le taux de mortalité, le dénombrement des *Listeria* dans les organes réticulo-endothéliaux, le cerveau et le liquide de lavage péritonéal des animaux infectés par voie intrapéritonéale.

Une étude statistique de ces paramètres a montré des différences de virulence entre les espèces, les sérotypes et les différentes souches de *Listeria*.

**Première partie :
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

I- RESERVOIRS

Listeria est une bactérie ubiquitaire que l'on trouve non seulement dans le milieu extérieur, sols, végétaux, eaux, mais également dans les produits alimentaires et chez les porteurs sains animaux et humains.

I-1- LE MILIEU EXTERIEUR

De nombreux auteurs ont montré la présence de *Listeria* dans le sol, en particulier LEHNERT. (42)

Sa résistance y est très importante (34). Elle est fonction de la nature du terrain, de la température et du pH.

La température optimale de développement est comprise entre 30 et 37°C.

Des pH de 5,6 à 9,6 sont tolérés, le pH optimal étant légèrement alcalin (7,2 à 7,6).

Il n'a cependant pas été prouvé que ce germe pouvait se multiplier dans le sol. Cette réponse fournirait un élément épidémiologique capital pour comprendre la maladie. *Listeria monocytogenes* est-elle un hôte normal de la flore tellurique ou y est-elle introduite par les réservoirs humains ou animaux (fèces, placenta, sécrétions utéro-vaginales...) ? (52)

Parmi les autres éléments du milieu extérieur on retrouve des *Listeria* dans l'eau, le fumier, la paille et l'ensilage. (38)

Les *Listeria* sont retrouvées avec une même fréquence, dans les ensilages d'herbe et de maïs. Mais, les isolements sont significativement plus fréquents dans les ensilages de mauvaise qualité à pH élevé, que dans ceux d'excellente qualité à pH inférieur à 4.

I-2- PRODUITS D'ORIGINE ALIMENTAIRE

I-2-1- LAIT ET PRODUITS LAITIERS

I-2-1-1- Lait

Le lait contaminé fut suspecté dès 1953 par POTEL, comme un mode possible de transmission de la Listeriose à l'homme.

C'est en réalité à partir de 1983 avec l'épidémie de Boston (20) que l'attention fut véritablement attirée sur cet aliment.

D'après de récentes estimations effectuées aux USA (45), au Canada (17), en Hollande (7), en Espagne (14), il apparaît que 1 à 45% des échantillons de lait cru sont contaminés par *Listeria monocytogenes*.

L'origine de cette contamination peut être double. D'une part, la vache peut excréter *Listeria monocytogenes*, et ceci même en l'absence d'une mammité patente. D'autre part, le lait peut être souillé par l'environnement de la ferme ; en effet plus de 10% des vaches ont une coproculture positive à *Listeria*.

Peu de recherches ont été effectuées en vue d'estimer la présence éventuelle de *Listeria* dans des laits pasteurisés, toutefois, une équipe espagnole a trouvé 21% des échantillons contaminés (25). Là encore, plusieurs possibilités peuvent expliquer ce résultat. Une pasteurisation insuffisante est la plus vraisemblable, mais une contamination secondaire dans la laiterie est possible, enfin le lait peut être contaminé lors du conditionnement.

I-2-1-2- Produits laitiers

Les fromages ont fait l'objet du plus grand nombre d'études, aussi bien en ce qui concerne la fréquence de contamination que sur le comportement de *Listeria monocytogenes* dans ce type d'aliment.

Des résultats publiés, il ressort que 0,5 à 10 % des fromages sont porteurs de *Listeria monocytogenes* (7,10,16,63,93). Ce sont les fromages à pâtes molles qui sont les plus contaminés.

I-2-2- PRODUITS CARNES

Les produits carnés issus de viandes crues de bœuf ou de porc, de charcuterie ou de volailles (en particulier les poulets) sont contaminés dans des proportions atteignant jusqu'à 40% dans certains produits. (13,41,56,63)

I-2-3- LES ŒUFS

L'infection de l'œuf peut s'effectuer au cours de la septicémie listérienne de la poule. Expérimentalement, ce fait n'a pas pu être démontré. Mais l'œuf semble bien constituer un vecteur de bactéries.

KAMPELMACHER a isolé *Listeria monocytogenes* de 29% de fèces d'individus apparemment sains, travaillant dans un élevage industriel avicole. (34)

I-2-4- AUTRES ALIMENTS

Les légumes et crudités furent suspectés lors de l'épidémie de Boston, en 1979 (28) et celle du Canada, en 1981 (81).

Dans ce dernier cas une épidémie à *Listeria* est survenue après consommation de "coleslaw", plat régional à base de chou. Le champ où était cultivé le chou aurait été souillé par les déjections d'animaux, porteurs probablement de *Listeria*. Puis, la conservation ultérieure de ce chou dans des chambres froides, aurait permis un "enrichissement" sélectif en *Listeria monocytogenes*. (81)

Récemment, WEAGENT et coll. ont mis en évidence dans 26% d'échantillons de fruits de mer la présence de *Listeria*. (95)

I-3- LES ETRES VIVANTS

Si les malades peuvent être considérés comme des vecteurs de *Listeria monocytogenes*, le rôle épidémiologique le plus important revient, de toute évidence, aux porteurs sains ou chroniques, qui constituent des véhicules subtils et dangereux de la bactérie.

I-3-1- LES MALADES

Les produits biologiques dans lesquels sont présentes les bactéries sont soit les liquides foeto-maternels (liquide amniotique) et le placenta, soit le cerveau et le LCR dans les méningo-encéphalites, soit les urines et les fèces très souvent bacillifères, soit les sécrétions des muqueuses conjonctivales et rhinopharyngées, soit, enfin, les lésions cutanées rencontrées surtout chez l'enfant.

Chez un malade humain ou animal, presque toutes ses sécrétions et excréctions représentent une source possible de contamination diffusée dans le milieu extérieur.

I-3-2- LES PORTEURS DE GERMES

I-3-2-1- Porteurs chroniques ou convalescents

Ce sont des sujets qui présentent une guérison clinique, mais non bactériologique.

Comme le souligne RAPPAPORT, les femmes ayant présenté un avortement d'origine listérienne et sous traitement, éliminent le bacille pendant au moins 20 semaines. (69)

I-3-2-2- Porteurs sains

Leur existence, tant chez l'homme que chez l'animal, peut vraisemblablement suffire pour expliquer les nombreuses inconnues épidémiologiques, relatives aux sources possibles de contamination.

KAMPELMACHER a isolé *Listeria monocytogenes* des fèces chez 11,9% du personnel travaillant dans un abattoir. DURST et coll. (43), en Hongrie, trouvèrent 1,78 % des échantillons de matières fécales positifs chez l'homme dans une recherche portant sur 4591 personnes.

Chez les animaux sains, sauvages ou d'élevage, les isollements de *Listeria* à partir des matières fécales sont réalisés dans 10 à 32% des cas, ces chiffres variant selon les pays et les auteurs. Dans la province de Frise, par exemple, 15,3% des échantillons des selles sont positifs.

Ces résultats dénotent la nature ubiquitaire et le plus souvent saprophytique de ce germe.

II- POUVOIR PATHOGENE

La listeriose humaine et animale est provoquée essentiellement par *Listeria monocytogenes*.

Il a été démontré que le sérovar 4b est le plus fréquemment responsable de listérioses humaines (49,78) et animales (78), alors que le sérotype 1/2 est le plus fréquemment isolé dans les aliments. (56)

Listeria innocua, *Listeria seeligeri* et *Listeria welshimeri* ont été classées comme non pathogènes (74,82), bien que *Listeria seeligeri* ait déjà provoqué une méningite chez un individu à risque. (76)

Au contraire, *Listeria ivanovii* est considérée comme pathogène chez les ovins-bovins (11,31,87), mais beaucoup moins que *Listeria monocytogenes*. (30)

La listeriose est caractérisée cliniquement, chez l'homme comme chez l'animal, par trois formes principales, citées par ordre de fréquence :

- formes méningo-encéphaliques,
- formes abortives,
- formes septicémiques.

II-1- LISTERIOSE HUMAINE

Elle atteint préférentiellement, d'une part la femme enceinte, et par voie de conséquence le nouveau-né, et d'autre part l'adulte âgé.

L'infection se caractérise dans les deux cas par une septicémie, de gravité variable, associée ou non à une infection du système nerveux central.

II-1-1- LISTERIOSE FŒTO-MATERNELLE

C'est une atteinte bénigne pour la mère, qui passe le plus souvent inaperçue sous la forme d'un syndrome pseudo-grippal, infection urinaire, diarrhée... mais jamais de méningite. Au contraire, l'infection est très grave pour le fœtus (avortement), et le nouveau-né. Deux grandes symptomatologies sont observées : la septicémie et/ou la méningite.

Schématiquement, quatre principaux mécanismes de contamination du fœtus ont été décrits, essentiellement sur la base de données anatomo-pathologiques auxquelles ont beaucoup contribué les travaux de SARRUT. (80)

*** La voie hématogène transplacentaire : (72)**

A la suite de l'infection de la mère durant le mois précédent l'accouchement, *Listeria monocytogenes* gagne le placenta puis le fœtus par voie sanguine, avec pour conséquence la naissance d'un enfant prématuré septicémique.

*** La voie ascendante transmembranaire :**

Le point de départ est cervico-vaginal, *Listeria monocytogenes* pénétrant dans la cavité amniotique, que les membranes soient rompues ou non.

Selon la durée de la contamination, l'enfant souffrira d'une méningite ou naîtra sain (liquide gastrique et/ou méconium souvent positifs à *Listeria*).

*** Origine endométriale :**

C'est le mécanisme le plus fréquent ; le point de départ de l'infection est un abcès souvent rétroplacentaire pouvant rester quiescent (l'enfant naîtra sain, mais liquide gastrique et/ou méconium pourront être positifs à *Listeria*) ou, au contraire, se compliquer d'une placentite miliaire entraînant une infection grave du fœtus ou du nouveau-né (septicémie et/ou méningite).

*** Contamination durant l'accouchement lors de la traversée des voies génitales contaminées.**

II-1-2- LISTERIOSE DE L'ADULTE

Elle touche avec une plus grande fréquence les sujets âgés, et les sujets immunodéprimés. Elle se traduit le plus souvent par une septicémie isolée, ou accompagnée d'une infection du système nerveux central : méningite, méningo-encéphalite, plus rarement, encéphalite au pronostic plus grave.

* Infections du système nerveux central.

Ces infections concernent plus volontiers le sexe masculin (60 à 78% des cas) et l'âge moyen est compris entre 53 et 57 ans.

Ces formes cliniques représentent 45 à 71% des formes de l'adulte.

* Autres formes.

Les septicémies touchent des patients dont l'âge est inférieur à celui observé lors des infections du système nerveux central (47 ans). Leur pronostic reste sévère, car elles surviennent essentiellement chez des patients souffrant d'une affection sous-jacente immunodéprimante.

Des localisations extrêmement atypiques sont signalées dans la littérature, telles que endocardite, pleurésie et abcès du poumon, hépatite et péritonite, conjonctivite, ou encore listériose cutanée.

De toutes ces localisations, l'endocardite est la plus fréquente, survenant dans plus de la moitié des cas, chez des patients ayant des antécédents cardiaques.

Résultats du sérotypage de souches de *Listeria monocytogenes* provenant de 1363 cas humains de listériose. (49)

Sérovar	Association à la grossesse (%) ^a	Sans association à la grossesse			Etat de santé non connu	Total (%)
		Avec maladie sous-jacente (%) ^a	En bonne santé (%) ^a			
1/2a	68 (13%)	83 (18%)	18 (13%)	38	207 (15%)	
1/2b	36 (7%)	62 (14%)	12 (9%)	30	140 (10%)	
1/2c	4 (1%)	35 (8%)	7 (5%)	3	49 (4%)	
3	1	6 (1%)	3 (2%)	5	15 (1%)	
4b	380 (74%)	241 (53%)	86 (63%)	165	872 (64%)	
4 non 4b	23 (4%)	27 (6%)	10 (7%)	17	77 (6%)	
Non typable	0	3 (1%)	0	0	3	
TOTAL	512	457	136	258	1663	

^a La distribution des sérotypes entre ces trois groupes de patients était hétérogène (χ^2 test $p < 0,001$). Les distributions des sérovars 1/2b, 1/2c, et 4b ont été trouvées significativement différentes (χ^2 test, $p \leq 0,001$)

II-2- LISTERIOSE ANIMALE

Presque toutes les espèces animales, domestiques ou sauvages, peuvent être atteintes (55). Certains animaux sont porteurs de la bactérie ; 10 à 30% des bovins, ovins, porcins et poulets hébergent naturellement cette bactérie dans leur tube digestif (2). Cette contamination provient de l'alimentation, en particulier les ensilages de maïs défectueux.

II-2-1- FORME MENINGOENCEPHALIQUE

C'est la forme la plus fréquente chez les ruminants. Au début, l'animal accuse surtout des troubles du comportement, il s'isole, suit avec peine le troupeau, bute sur les obstacles. Les troubles de la vision accentuent ces troubles locomoteurs ; puis, une hémiplégie ou une paralysie s'installent.

Dans d'autres cas, l'animal tourne en rond.

Ce tableau clinique se termine par un coma et la mort.

II-2-2- FORME ABORTIVE.

Chez la femelle gestante, selon le stade de gestation et l'état de résistance individuelle, la maladie se traduit, soit par un avortement (12), soit par une mortinatalité, ou encore par la naissance de nouveau-nés infectés, présentant une septicémie, ou une méningite plus ou moins tardive.

Chez les bovins, quelques cas de mammites à *Listeria* ont été rapportés dans la littérature.

II-2-3- FORME SEPTICEMIQUE

Elle représente la forme commune de la maladie chez les petits animaux (rongeurs, carnivores, oiseaux) et les sujets jeunes, quelle que soit l'espèce. La mort survient souvent de façon rapide, ou bien après anorexie et amaigrissement, soit sans signe prémonitoire.

III- PROTOCOLES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION

INTRODUCTION

Identifiée officiellement pour la première fois en 1926 par MURRAY, WEBB et SWANN (53), *Listeria monocytogenes* est restée jusqu'en 1948 (date de la description de *Listeria denitrificans*) (90), la seule espèce de ce genre, à laquelle ont été ultérieurement adjointes *Listeria grayi* (40) puis *Listeria murrayi* (96), respectivement en 1966 et 1971.

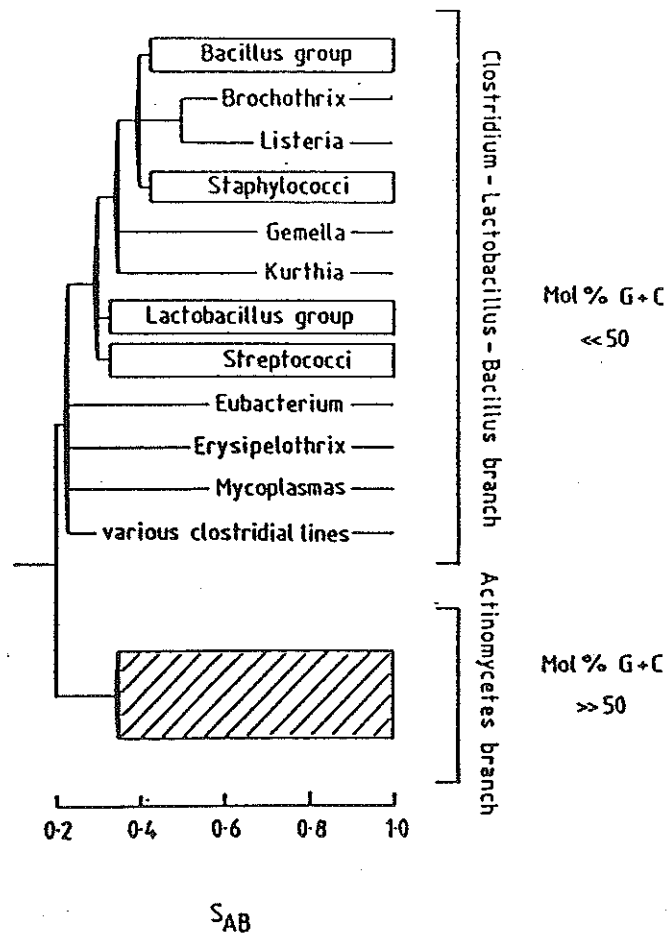
Depuis 1955, IVANOV étudiait les avortements listériens chez les brebis, en Bulgarie, et avait remarqué que le groupe de souches incriminé, manifestait une très forte hémolyse, et se distinguait par un nouveau sérovar : le sérovar 5 (31). Ces germes portent désormais le nom de *Listeria ivanovii*. (87)

L'étude phénotypique et sérotypique des souches isolées durant ces mêmes années, a conduit SEELIGER H.D.R. à nommer en 1981 *Listeria innocua* les souches non hémolytiques, expérimentalement non pathogènes, appartenant aux sérovats 6a et 6b (82).

Enfin, en 1982, de nouvelles hybridations ADN/ADN (75), entreprises à la suite de celles précédemment effectuées par WELSHIMER, ont mis en évidence deux nouvelles espèces : *Listeria seeligeri* et *Listeria welshimeri* (74).

Récemment, *Listeria denitrificans* a été attribuée à un nouveau genre : *Jonesia* (73).

Durant cette dernière décennie, les techniques de recherche et d'isolement de *Listeria* ont beaucoup évolué. Bien que ce germe se cultive en aérobiose sur milieu ordinaire, il n'est présent qu'en petit nombre dans les aliments et les échantillons contaminés du milieu extérieur, où réside une flore très variée.

Classification de *Listeria* par rapport aux autres bactéries gram positives (33)

La première technique mise au point, a été l'enrichissement au froid, pendant un mois, permettant, en inhibant la croissance des autres germes, le développement de *Listeria*.

Puis des techniques beaucoup plus rapides, grâce à l'utilisation d'antibiotiques, ont permis d'éliminer la flore secondaire, comme dans le protocole FDA, le milieu Oxford et le Palcam.

Aujourd'hui, les techniques de recherche par les sondes, les anticorps monoclonaux et les Polymérase Chaîne Réactions (PCA), complètent les techniques microbiologiques traditionnelles.

III-1- LES METHODES CLASSIQUES D'ISOLEMENT

III-1-1- RECHERCHE DE *LISTERIA* APRES ENRICHISSEMENT AU FROID

PRE-ENRICHISSEMENT

10 g d'aliment sont broyés dans 90 ml d'eau peptonée tamponnée conservés 1 mois à +4°C



ENRICHISSEMENT

3 ml du mélange pré-enrichi sontensemencés dans
30 ml de milieu "*Listeria* enrichment broth" (Merck)
+ acide nalidixique 40 µg
+ colistine 3 µg



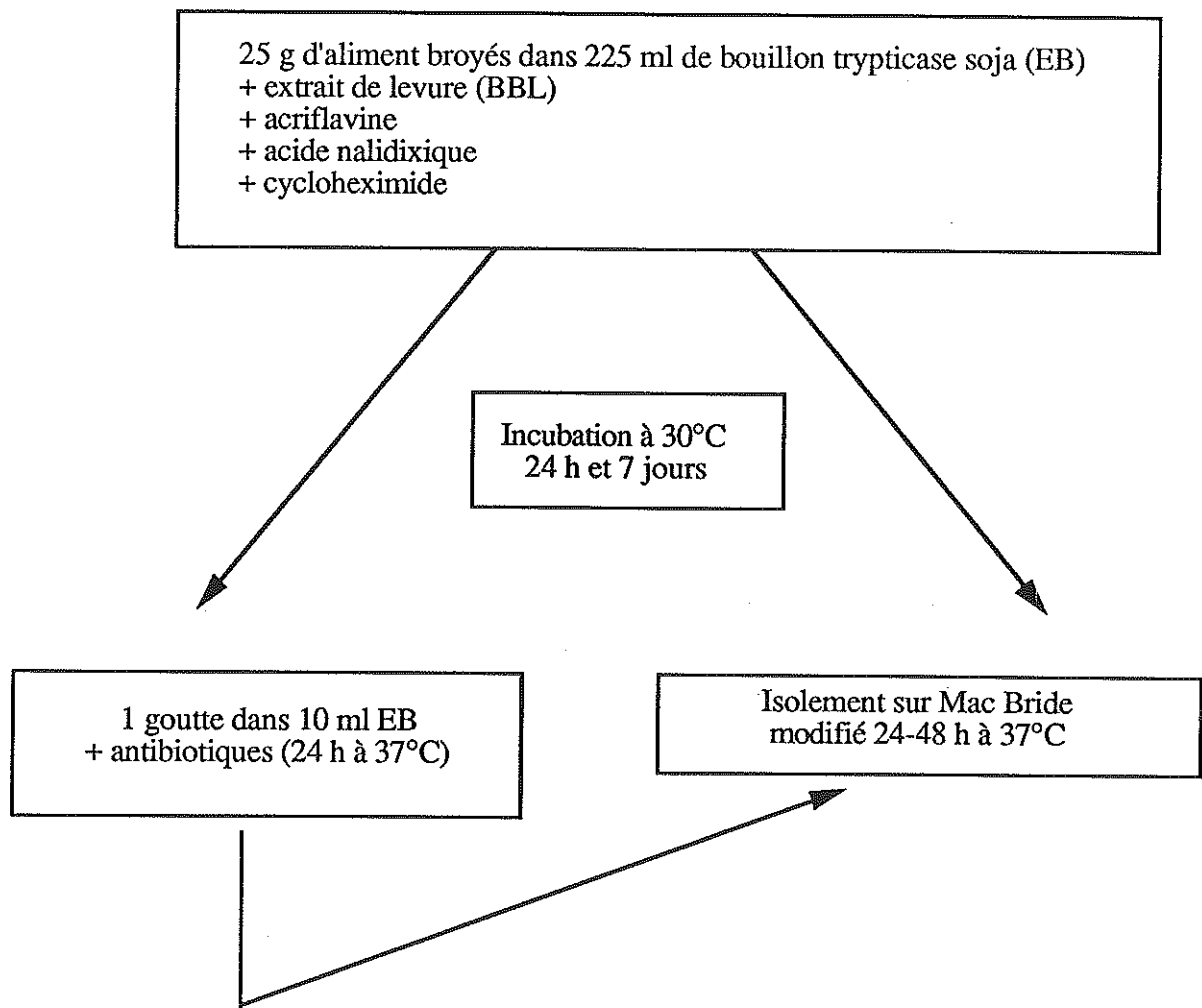
8 jours à 37°C

ISOLEMENT

Sur gélose trypticase-soja en 24-48 h à 37°C

III-1-2- RECHERCHE DE *LISTERIA* SELON LE PROTOCOLE FDA

ENRICHISSEMENT



III-1-3- RECHERCHE DE *LISTERIA* PAR LE MILIEU SELECTIF OXFORD

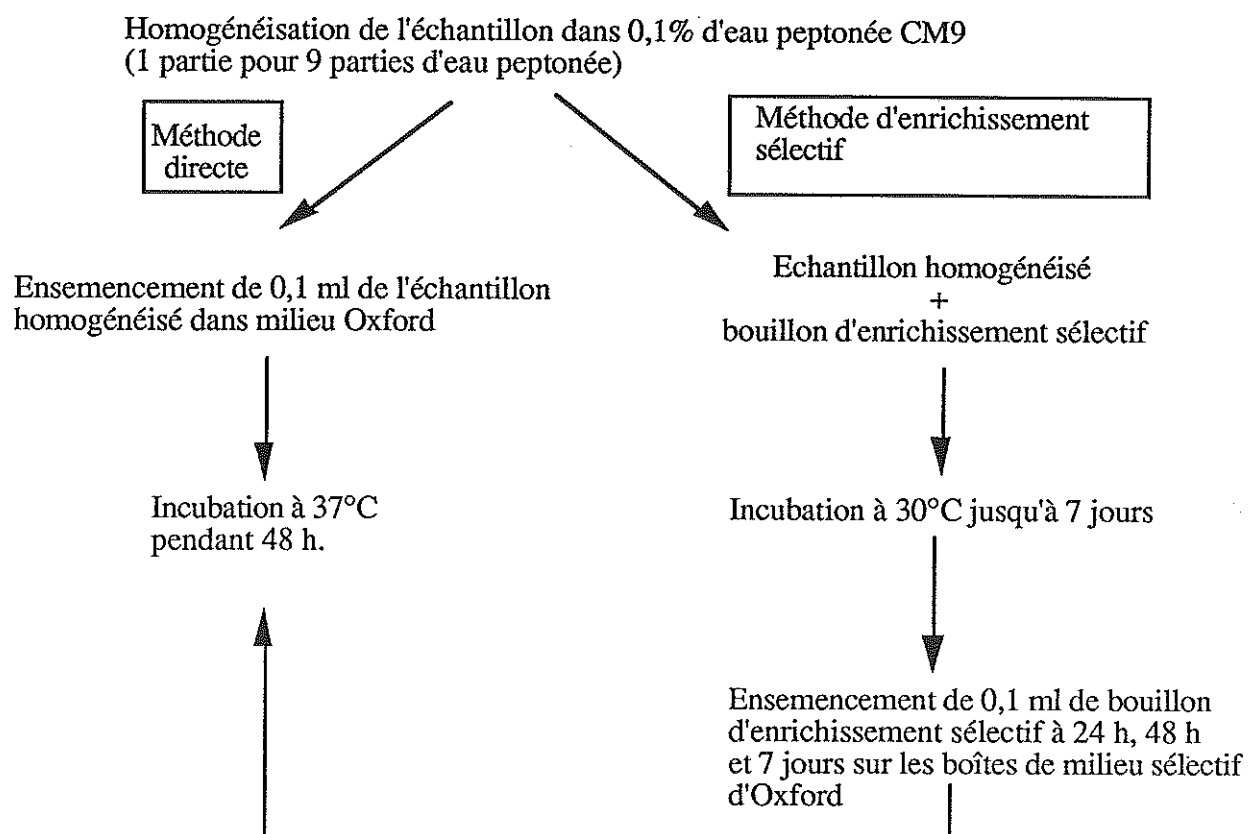
COMPOSITION

*	gélose de base	
	gélose Columbia	39 g/l
	esculine	1 g/l
	citrate ammoniacal ferrique	0,5 g/l
	chlorure de lithium	15 g/l
	eau	1 l

pH $7 \pm 0,2$

*	supplément sélectif (par flacon)	
	cycloheximide	200 mg
	colistine (sulfate)	10 mg
	acriflavine	2,5 mg
	cefotetan	1 mg
	fosfomycine	5 mg

Chaque flacon permet de supplémenter 500 ml de milieu. Les boîtes coulées sont constituées d'un mélange de ces deux préparations.



III-1-4- RECHERCHE DE *LISTERIA* PAR L'AGAR SELECTIF PALCAM
LISTERIA

COMPOSITION-TYPE

* Agar sélectif base Palcam *Listeria*

peptone	23 g/l
amidon	1 g/l
chlorure de sodium	5 g/l
mannitol	10 g/l
ammonium fer citrate	0,5 g/l
esculine	0,8 g/l
glucose	0,5 g/l
chlorure de lithium	15 g/l
rouge de phénol	0,08 g/l
agar-agar	13 g/l

* Supplément sélectif Palcam *Listeria*

sulfate de polymyxine B	5 mg/flacon
ceftazidine	2,5 mg/flacon
acriflavine	2,5 mg/flacon

Un flacon suffit pour préparer 500 ml de milieu. Le milieu sélectif Palcam est constitué d'un mélange de ces deux préparations.

Ensemencement de 0,1 ml d'un enrichissement sélectif ou directement d'une suspension homogène de matériel échantillon dans l'eau peptonée à 0,1 % sur l'agar sélectif Palcam par la méthode d'ensemencement en surface.



Incubation sous atmosphère aérobie ou microaérophile de 30 à 37°C jusqu'à 48 h.

Dans chacun des protocoles, les boîtes peuvent être lues après 24 et 48 heures à 37°C, pour étudier les colonies typiques de *Listeria*.

Elles sont examinées en transillumination oblique (Méthode de Henry) sur gélose trypticase-soja, et montrent une coloration bleutée.

III-2- IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE (71)

L'ensemble des caractères permettant l'identification du genre *Listeria* figurent dans le tableau suivant :

Caractères morphologiques et biochimiques du genre *Listeria*

Bacille à Gram positif
Asporulé
Non capsulé
Mobile à 22°C (ciliature péritriche)
Aérobic (anaérobic facultatif)
Catalase ⊕
Oxydase O
Glucose : fermentation sans gaz
Esculine hydrolysée
Rouge de Méthyle ⊕
Voges Proskauer ⊕
Urée non hydrolysée
Indole et H ₂ S non produits

L'identification d'espèce est basée sur la recherche de 5 caractères : l'hémolyse spontanée, le Camp-test avec *Rhodococcus equi*, la production d'acide à partir du D-xylose, du L-rhamnose, de l'alpha méthyl D-mannoside et du mannitol, ainsi que la réduction des nitrates (77). (cf. tableau 1)

Tableau 1 :
Différenciation des espèces de *Listeria*

Espèce	pathogénicité	Hémolyse spontanée	CAMP-test <i>R. equi</i>	Production d'acide à partir de				Mannitol	Réduction des nitrates
				D-xylose	L-rhamnose	Alpha-méthyl D-mannoside			
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	v	+	-	-	
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	+	v	+	-	-	
<i>L. seeligeri</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	
<i>L. murrayi</i>	-	-	-	-	-	+	+	+	

v : caractère variable

Listeria grayi et *Listeria murrayi* sont rarement isolées des produits biologiques. Elles se distinguent des autres espèces de *Listeria* par leur capacité à fermenter le mannitol. *Listeria murrayi* se différencie de *Listeria grayi* par sa capacité à réduire les nitrates.

Parmi les autres espèces fréquemment isolées dans les aliments, *Listeria innocua* et *Listeria welshimeri* ne présentent pas d'activité hémolytique. *Listeria welshimeri* se distingue de *Listeria innocua* par sa production d'acide à partir du D-xylose.

Enfin, *Listeria monocytogenes* se différencie de *Listeria seeligeri* grâce à la production ou non d'acide, à partir du xylose et du rhamnose. (cf. tableau 1)

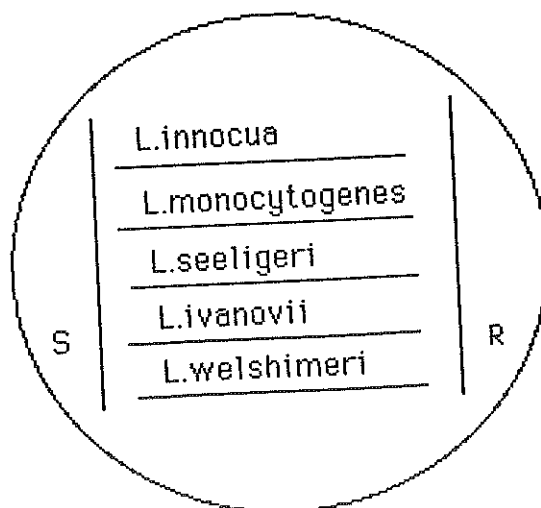
Listeria monocytogenes, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri* ont une activité hémolytique spontanée.

Le Camp-test permet cependant de les différencier.

Dans ce test, des exosubstances pré-purifiées (la bêta toxine de *Staphylococcus aureus* CIP 5710 (S) et l'equi facteur de *Rhodococcus equi* CIP 5859 (R)), d'activité connue, ont été appliquées parallèles l'une à l'autre, sur la surface de la gélose au sang.

Les souches de *Listeria* ont été alors inoculées, à angle droit par rapport aux lignes de ces exosubstances.

Après incubation à 35°C pendant 24 à 48 heures, les plaques sont examinées pour l'hémolyse.



C'est ainsi que l'on peut distinguer *Listeria ivanovii* de *Listeria monocytogenes* et *Listeria seeligeri*.

En effet, l'hémolyse de *Listeria ivanovii* est accrue près de la raie de *Rhodococcus equi*, alors que celles de *Listeria monocytogenes* et *Listeria seeligeri* sont accentuées dans la zone d'influence de la raie de *Staphylococcus aureus*.

III-3- LA SEROTYPYPIE ET LA LYSOTYPYPIE

Lors d'une étude épidémiologique de listeriose humaine, une caractérisation très fine des souches, isolées dans l'aliment suspect et chez le patient est nécessaire.

Pour cela des méthodes de typage sont utilisées pour caractériser *Listeria*.

III-3-1- LA SEROTYPYPIE

L'étude des antigènes somatiques (antigènes O) et des antigènes flagellaires (antigènes H) ont conduit JULIANELLE puis PATERSON à diviser le genre *Listeria* en 4 types sérologiques.)

Par la suite, ce schéma antigénique a été complété par SEELIGER et LINZENMEIER (86), DONKERVOET (15) et encore SEELIGER (84,88) pour aboutir à la classification actuelle

(cf. tableau 1).

Les études d'hybridation ADN-ADN révèlent l'existence de 5 groupes génomiques (75) correspondant aux espèces *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua* déjà connues, *Listeria welshimeri* et *Listeria seeligeri* décrites plus tard (74).

Listeria grayi et *Listeria murrayi* n'appartiennent à aucun de ces groupes.

Les acides teichoïques de paroi représentent l'antigène somatique. Ils sont actuellement au nombre de 15, numérotés de I à XV. Les cils confèrent à la bactérie des propriétés antigéniques H pour lesquelles 5 types A, B, C, D, E ont été décrits.

La combinaison des deux types antigéniques O et H définit le sérovar complet de la souche (85). Par exemple, le sérovar 1/2a comprenant les antigènes somatiques I, II et de façon inconstante III et les antigènes flagellaires A et B, s'écrit I, II (III), AB.

On distingue 16 sérovats pour le genre *Listeria* :

1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7, 5, 6a, 6b.

Le sérovar constitue un caractère d'identification supplémentaire, dans le cas de *Listeria ivanovii*, où toutes les souches de cette espèce appartiennent au sérovar 5 (et réciproquement toutes les souches de ce sérovar appartiennent à cette espèce).

De plus, l'antigène flagellaire E est spécifique de *Listeria grayi* et *Listeria murrayi*.

En revanche, si pendant de nombreuses années les sérogroupes 1/2 et 4 ont été considérés comme spécifiques de *Listeria monocytogenes*, cette notion a été remise en question avec la description en 1983 de nouvelles espèces. En effet, des souches de *Listeria seeligeri* et *Listeria welshimeri* sont parfois caractérisées par ces formules antigéniques. (72)

III-3-2- LYSOTYPIC

La lysotypie permet de caractériser les souches de façon plus précise et de vérifier l'introduction de nouvelles souches.

Des bactériophages ont été caractérisés (5) et peuvent être utilisés pour la lysotypie. Leur spectre lytique qui est spécifique de l'espèce, et/ou du séro groupe des souches bactériennes, permet de subdiviser des souches de même sérovar en plusieurs groupes.

Face à l'intérêt de ce typage lors d'investigations épidémiologiques, 25 phages ont été sélectionnés en 1985 lors d'une étude pour la lysotypie de *Listeria monocytogenes* (70).

On dénombre actuellement 25 lysotypes parmi les souches des sérovats 1/2a, 1/2b, 1/2c et 119 pour celles des sérovats 4.

On observe une corrélation totale entre, sensibilité aux phages et type sérologique des souches.

Tableau I
 Serovars du genre *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* and *L. murrayi*)
 Schéma de PATERSON modifié et complété par Seeliger et Donker-Voet.

		O-antigenic factors			H-antigenic factors		
<i>L. monocytogenes</i> *	1/2a	(III)			A B C		
	1/2b	(III)			A B C		
	1/2c	(III)			A B C		
	3 a	(III)	IV		A B C	D	
	3 b	(III)	IV	(VII XIIII)	A B C		
	3 c	(III)	IV	(VII XIIII)	A B C		
	4 a	(III)	(V)	VII IX	A B C	D	
	4 a b	(III)	V	VII IX X	A B C		
	4 b	(III)	V	VII IX	A B C		
	4 c	(III)	V	VII	A B C		
4 d	(III)	(V)	VII VIII	A B C			
4 e	(III)	V	(VIII) (IX)	A B C			
7	(III)			A B C			
<i>L. ivanovii</i>	5	(III)	(V) VI	(VIII) X	A B C		
<i>L. innocua</i>	6a ("4 6")	(III)	V (VI) (VII)	(IX) X XI	A B C		
	6b ("4 9")	(III)	(V) (VI) (VII)	IX X XI	A B C		
<i>L. grayi</i>		(III)				E	
<i>L. murrayi</i>		(III)				E	

* *L. seeligeri* can ne peut être distingué sérologiquement de *L. monocytogenes*.
L. welshimeri " " " "*L. innocua* 6b
 () pas toujours présent.

III-4- MOBILITE ELECTROPHORETIQUE DES ISO-ENZYMES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Très récemment, une étude a permis de discriminer des groupes de souches au sein du même sérovar.

L'électrophorèse d'enzymes "multilocus" a été employée pour étudier la structure génétique et l'épidémiologie d'un certain nombre de bactéries pathogènes de genres variés.

Par cette méthode, les isollements bactériens se sont différenciés suivant la variation dans la mobilité électrophorétique d'un grand nombre d'enzymes métaboliques.

PIFFARETTI et al. (62) ont appliqué l'électrophorèse d'enzymes "multilocus" à l'analyse de la structure génétique de *Listeria monocytogenes*.

175 isollements de *Listeria monocytogenes* en provenance de cas cliniques humains (sang et liquide cébrospinal) d'animaux, de sources environnementales d'Europe, d'Amérique du Nord, ont été analysés électrophorétiquement par variation allélique de 16 locus génétiques codant des enzymes métaboliques.

45 profils d'allèles distincts (types électrophorétiques ETs) ont été distingués.

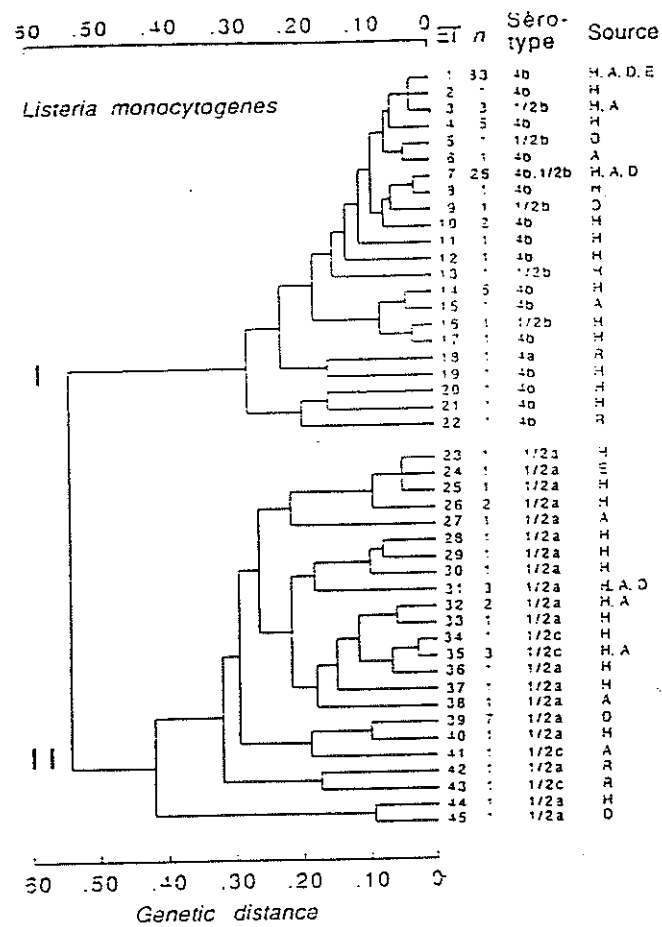
L'analyse d'une matrice de distances génétiques entre des types électrophorétiques (ETs) a révélé deux premières divisions phylogénétiques des espèces, séparées d'une distance de 0,54.

Les électrophorétypes dans la division I sont représentés par les souches de sérotype 4b, 1/2b et 4a ; alors que les souches des électrophorétypes de la division II sont de sérotype 1/2a et 1/2c.

La distribution étendue de certains électrophorétypes indique que la structure génétique de *Listeria monocytogenes* est clonale.

Un clone marqué par ET1 a causé des épidémies majeures dans l'ouest de la Suisse (période 1983-1987), et dans le comté de Los Angeles, Californie, en 1985. Elles sont toutes les deux attribuées à la contamination de fromage à pâte molle.

ET1 est voisin du clone ET7, lequel a causé deux grandes épidémies de listeriose dans le Massachusetts en 1979 et 1983.



Rapport génétique entre 45 électrophorétypes de *Listeria monocytogenes* (62)

n : nombre d'isollements

H : humain

A : animal

D : produits laitiers

E : environnement

R : souche de référence

Une importante question se pose pour la recherche en épidémiologie et génétique : pourquoi, étant donné la diversité clonale étendue des populations de *Listeria monocytogenes* (45 clones identifiés), le clone représenté par ET1 est-il l'agent étiologique dans les épidémies de Californie et de Suisse par l'intermédiaire de la contamination d'un fromage à pâte molle ?

Il y a plusieurs possibilités :

1) Le clone ET1 peut être particulièrement bien adapté pour la croissance et/ou la survie dans le fromage.

2) ET1 peut être relativement abondant dans l'environnement et, par conséquent, être l'agent de n'importe quel épisode de maladie, par l'intermédiaire de la contamination de produits d'alimentation.

3) ET1 peut avoir un haut niveau de pathogénicité exceptionnel.

Cette issue ne peut être résolue tant qu'il n'y a pas davantage d'informations sur la variation des propriétés physiologiques (virulence incluse) des divers clones et de leurs distributions géographiques, ainsi que de leur relative abondance dans l'environnement.

III-5- LES SONDÉS

Le genre *Listeria* se compose d'un groupe hétérogène de microorganismes parmi lesquels, seules les espèces *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* sont pathogènes pour les humains et les animaux.

De récentes épidémies ont stimulé un intérêt parmi les laboratoires cliniques et les agences de santé publique, pour développer un test rapide afin de dépister *Listeria monocytogenes* des échantillons humains et dans les aliments.

Une technique prometteuse est celle utilisant un test d'hybridation d'ADN, basée sur l'utilisation d'une sonde à ADN spécifique pour *Listeria monocytogenes*.

La sonde idéale pourrait donc être celle codant un facteur de virulence.

Parmi les facteurs qui contribuent à la virulence de *Listeria monocytogenes*, on note l'hémolysine et par exemple, les facteurs qui facilitent la survie intracellulaire et causent une hypersensibilité retardée.

SERVE NOTERMANS et col.(58) ont ainsi utilisé un gène codant une protéine hypersensibilité retardée induite, d'une souche de *Listeria monocytogenes* virulente sérotype 1/2a qu'ils ont clonée et séquencée. Cette étude a montré que la présence du gène est hautement corrélée avec les types virulents de *Listeria*.

Ceci suggère donc son utilité comme sonde pour la détection de *Listeria monocytogenes* dans la nourriture, les échantillons cliniques et environnementaux.

D'ailleurs, les résultats ont montré que la sonde à ADN utilisée était spécifique pour la détection des espèces pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*.

Actuellement une sonde nucléique est commercialisée : il s'agit d'une sonde d'ADN reconnaissant une séquence de l'ARN ribosomique 16S spécifique de *Listeria*.

III-6- LES ANTICORPS MONOCLONAUX

Un test diagnostique rapide pour la détection de *Listeria* dans les produits alimentaires a été créé.

Ce test, connu comme *Listeria*-Tek, utilise deux anticorps monoclonaux spécifiques pour *Listeria* dans l'essai d'immunoabsorption de l'enzyme liée (ELISA).

Ce test peut être utilisé avec des produits laitiers, des produits carnés et des échantillons environnementaux.

40 heures d'enrichissement en bouillon sans culture, sur milieu solide, sont nécessaires. Les résultats sont disponibles dans les 48 heures après que la procédure d'enrichissement soit initiée.

MATTINGLY et al. (51) ont produit des anticorps monoclonaux contre *Listeria*. Ces anticorps monoclonaux ont été entièrement testés par Western blot et autres méthodes pour montrer leur spécificité pour *Listeria*.

Le *Listeria*-Tek apparaît être plus sensible que les méthodes de culture pour détecter les *Listeria* dans les produits alimentaires.

III-7- LES POLYMERASE-CHAINE REACTIONS (PCR)

De récents développements dans la biologie moléculaire ont accru les possibilités de détecter les organismes pathogènes dans les aliments et autres échantillons.

La technique développée récemment des PCR, utilisant une ADN polymérase thermostable (79), permet la rapide amplification de séquences d'ADN spécifiques. Ceci constitue un avantage intéressant par rapport aux autres méthodes publiées, qui nécessitent un nombre important de cellules cibles, afin que les résultats soient sans ambiguïté (97).

Les PCR ont été décrites comme capables de détecter de bas taux d'*Escherichia Coli* dans les échantillons cliniques (59), *Pseudomonas cepacia* dans des échantillons de sols (91), et *Aeromonas salmonicida* dans le poisson (6).

Un travail reporté par BORDER P.M. et al. (9) décrit l'utilisation de sondes d'oligonucléotides synthétiques pour la recherche des *Listeria*. Ce sont des amorces complémentaires d'un brin d'ADN bactérien, qui en présence de Taq DNA polymérase et de nucléotides, vont amplifier par polymérisation une région déterminée du génome des bactéries.

Les polymérase-chaîne réactions sont exécutées sur les extraits d'ADN ou lysats cellulaires bruts (79).

Ces PCR sont donc utilisées comme test diagnostic sur les bactéries isolées d'échantillons de nourriture variés, pour détecter les espèces de *Listeria*, et *Listeria monocytogenes*.

IV- VIRULENCE

IV-1- LES FACTEURS EXPRIMANT LE POUVOIR PATHOGENE

IV-1-1- L'HEMOLYSINE

Jusqu'en 1961, le manque d'information concernant l'hémolysine de *Listeria monocytogenes* ne permettait pas d'établir de rapport entre cette exotoxine et la pathogénicité de cet organisme.

A partir de 1963, elle a été considérée comme le plus important facteur de virulence.

A partir de 1986, avec l'étude d'une souche de *Listeria monocytogenes* devenue avirulente après mutagénèse, commença l'étude du rôle de cette toxine dans la virulence (8,26).

L'hémolysine apparaît comme une protéine antigénique thermolabile. Son activité lytique est augmentée par des agents réducteurs, est supprimée par oxydation (32,57), l'action du cholestérol (36) ou de l'antistreptolysine (32).

Ces propriétés et les effets cardiotoxiques (37,89) sont apparemment similaires à ceux provoqués par la streptolysine O (SLO) (1). Ils ont suggéré que l'hémolysine devait appartenir au groupe des toxines bactériennes (SH) thiol activées, le prototype étant SLO.

Cette hémolysine a été appelée listeriolysine O, en accord avec la nomenclature recommandée par BEINHEIMER .

Elle est capable de se fixer au cholestérol des membranes cellulaires.

Le pH optimum nécessaire pour l'activité listeriolysine, est significativement plus bas que celui de toutes les autres toxines thiol-activées purifiées.

En effet, l'activité cytolytique maximum à pH 5,5 suggère que la listeriolysine doit être plus effective quand elle est exprimée à l'intérieur de l'environnement acide du phagosome.

IV-1-2- LE FER

Le fer est nécessaire à la croissance de toutes les bactéries, excepté le lactobacille (54).

Pendant l'infection, les microorganismes doivent acquérir le fer chez l'hôte.

L'hémolysine est d'autant plus sécrétée par la bactérie, que la teneur en fer du milieu est faible. En effet, l'infection démarre par une très rapide phagocytose de bactéries invasives, dans un environnement privé de fer, qui stimule la sécrétion de listeriolysine O.

L'internalisation des bactéries à l'intérieur des phagolysosomes des macrophages résidents, sollicite son accumulation locale et la liaison subséquente irréversible à la membrane sur les molécules de cholestérol. Il s'en suit une lyse des érythrocytes augmentée, avec libération concomitante d'hémoglobine, d'où un apport de fer favorisant la croissance bactérienne.

IV-1-3- CATALASE ET SUPEROXYDE DISMUTASE

Les cellules phagocytiques, en particulier neutrophiles et monocytes, répondent à l'attaque d'un microorganisme par la production d'un anion superoxyde réactif (O_2^-) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) qui prennent place sur la membrane phagosomale.

Le microorganisme envahissant doit faire face à l'action bactéricide de tels composants, et doit résister à leur action oxydative.

C'est ainsi que *Listeria monocytogenes* produit une supéroxyde dismutase extracellulaire et une catalase, qui peuvent inactiver les peroxydes et superoxydes élaborés par le macrophage.

Ces enzymes, catalase et superoxyde dismutase, peuvent donc jouer un rôle décisif dans la pathogénèse, et en conséquence doivent être regardés comme des facteurs de virulence.

IV-1-4- COMPOSANTS DE SURFACE : MONOCYTOSIS PRODUCING ACTIVITY (MPA) ET IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY (ISA)

Les capsules, facteurs de virulence importants dans beaucoup d'autres bactéries gram + et gram - pathogéniques, n'ont pas été décelées chez *Listeria monocytogenes* ou d'autres espèces de *Listeria*.

Cependant, deux composants apparaissent affecter la réponse immunitaire de l'hôte. Il s'agit du "monocytosis producing activity" (MPA) et de l'activité immunosuppressive (ISA). Ils ont été identifiés chez *Listeria monocytogenes* et supposés être des déterminants de la virulence (23,24).

La "monocytosis producing activity" accroît la production de monocytes caractéristiques dans la listériose.

L'activité immunosuppressive supprime la capacité des lymphocytes de la rate de l'animal à former des anticorps contre les antigènes étrangers.

MPA apparaît être un composant anionique de bas poids moléculaire (1000 daltons) qui est associé à la membrane cytoplasmique (60).

ISA a un poids moléculaire de 150 Kd.

MPA stimule les monocytes, mais pas les lymphocytes et les macrophages.

MPA réduit le temps de génération des précurseurs de monocytes et la 1/2 vie des monocytes sanguins in vivo (65).

Il a été suggéré que MPA est produit par *Listeria monocytogenes* à l'intérieur des macrophages (23).

IV-2- LE MODELE ANIMAL : LA SOURIS

INTRODUCTION

L'infection expérimentale des rongeurs avec *Listeria monocytogenes* a été largement utilisée pour l'étude de l'immunité à médiation cellulaire.

Ces dernières années, ce modèle a été employé pour l'étude des facteurs de virulence.

IV-2-1- LES DIFFERENTES VOIES D'INOCULATION

Lorsque les souris sont exposées à un inoculum subléta de *Listeria*, l'infection ultérieure suit une course bien définie, qui dure approximativement une semaine.

L'inoculation par les voies orales, intrapéritonéales, sous cutanées ou intraveineuses peut produire une infection.

De toutes celles-ci, seule la première nécessite un inoculum important ($\approx 10^9$) pour qu'il y ait infection.

La voie intraveineuse est la plus communément utilisée et nécessite de plus faibles doses.

Après une injection en intraveineuse d'une dose subléta de *Listeria*, la cinétique de la croissance bactérienne est suivie dans la rate et le foie des souris.

Les foies et les rates sont disséqués et homogénéisés.

Des dilutions successives des homogénats sont ensemencées et les colonies sont dénombrées après 24 heures.

Le maximum de l'infection splénique se situe au 3ème jour après l'inoculation. C'est pourquoi l'évaluation de la virulence des souches de *Listeria* repose sur la mesure de l'infection, par numération des bactéries dans la rate au 3ème jour après inoculation.

La DL₅₀ (3), le nombre de bactéries dans le système réticuloendothélial (48), et l'observation histomorphologique du foie (27) ont permis d'observer des différences de virulence entre les espèces de *Listeria*.

IV-2-2- VARIATION DES MECANISMES DE DEFENSE

L'immunité naturelle ou la résistance non spécifique à la listeriose peuvent être influencées par la bactérie elle-même, et aussi par des facteurs exogènes et endogènes de l'hôte. Le plus important facteur de l'hôte, chez des souches de souris consanguines, est leur susceptibilité génétique ou leur résistance à *Listeria monocytogenes*.

IV-2-2-1- L'âge

L'âge de la souris est crucial pour l'issue de l'infection (98). Comme le montre la figure 1, un souriceau nouveau-né n'a pratiquement pas de résistance innée à la bactérie.

La résistance augmente régulièrement après la naissance, jusqu'à l'âge de trois à quatre semaines, après quoi un niveau constant est acquis.

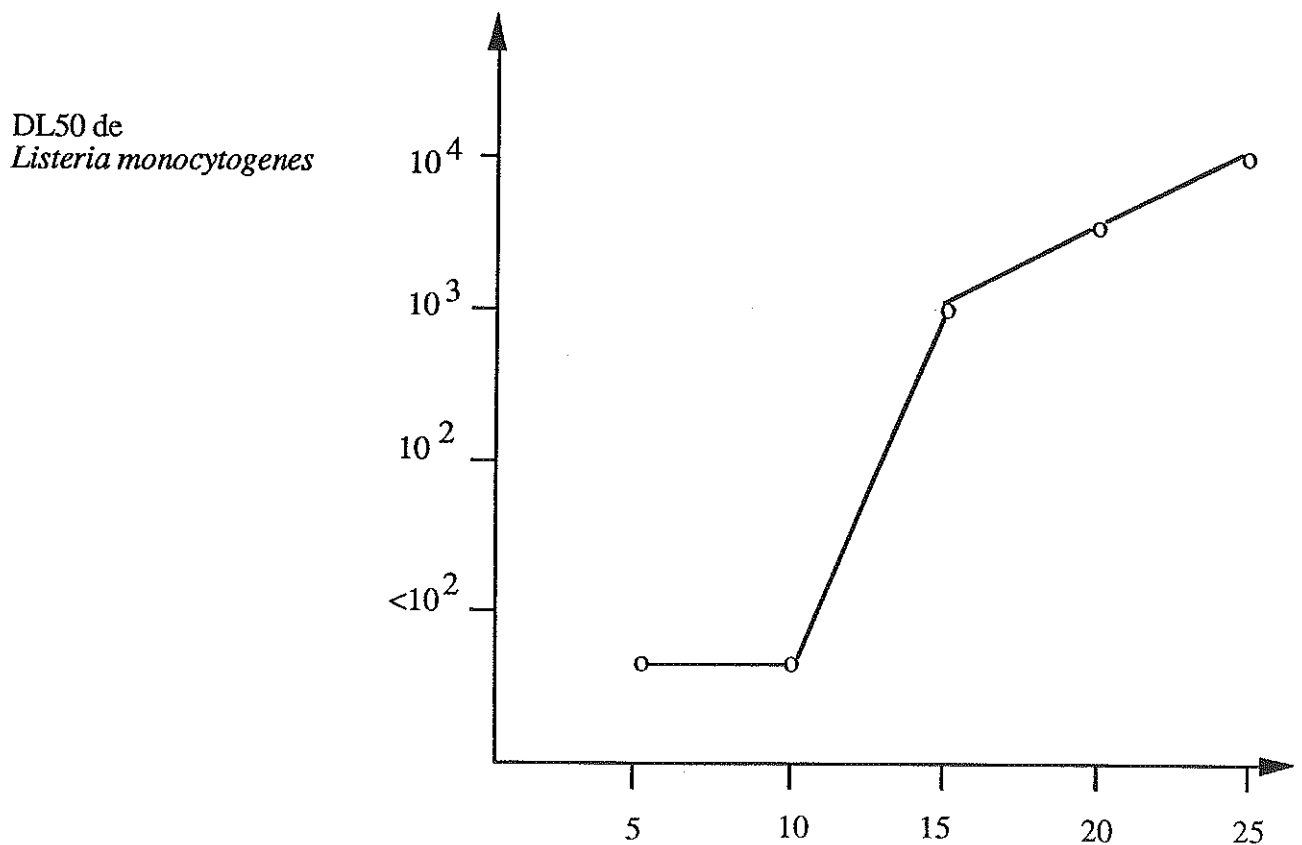


Figure 1 : Dose létale moyenne (DL50) de *Listeria monocytogenes* chez des jeunes souris NMRI infectées par voie intrapéritonéale en relation avec les jours après la naissance. (98)

En accord avec les données de YANG et SKINSNES (101) le développement de la résistance à *Listeria* suit la maturation fonctionnelle du système phagocyte mononucléaire.

D'autre part, comme le montre la figure 2, des souris âgées possèdent une résistance non spécifique augmentée, comparée aux animaux adultes jeunes.

Log 10

Listeria monocytogenes

par rate

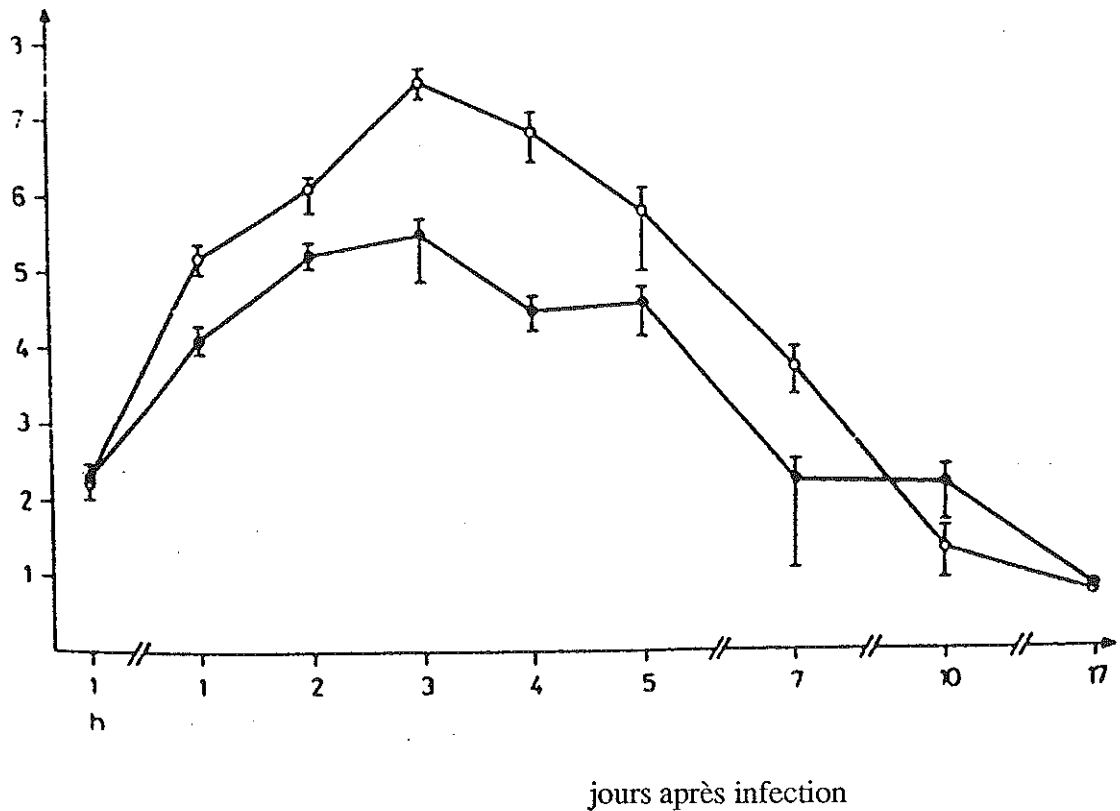


Figure 2 : Nombre de *Listeria monocytogenes* 4b dans des rates de 6 semaines (O) et 20 mois (•) de souris femelles NMRI après infection IV avec 0,1 x DL50.

Chaque point représente la moyenne de 5 à 6 souris.

IV-2-2-2- Immunocompétence

Listeria monocytogenes est un parasite intracellulaire facultatif, mettant en jeu une immunité à médiation cellulaire.

De nombreuses études sur l'animal ont été réalisées afin de mieux connaître les mécanismes de ce type d'immunité.

L'utilisation de sulfate de dextran pour déprimer la souris en macrophages (30), de ciclosporine pour déprimer l'animal en lymphocytes T (92), permet de montrer l'extrême sensibilité de l'animal ainsi traité, face à *Listeria monocytogenes*.

IV-2-2-3- Génétique

MAINOU-FOWLER T. et al (50) ont montré des différences génétiques dans la résistance à *Listeria*.

La virulence des souches représentatives des 5 espèces de *Listeria* a été comparée chez la souris C57BL/6 et chez la souris BALB/C.

Les résultats s'appuient sur la valeur de la DL50, la cinétique de la croissance bactérienne, ainsi que sur les changements histologiques au niveau des foies de souris.

Listeria ivanovii comme *Listeria monocytogenes* sont hautement pathogènes pour les 2 souris, C 57BL/6 et BALB/C.

Au contraire, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* et *Listeria seeligeri* sont presque entièrement avirulentes, comme le montre les valeurs élevées de DL50.

Cependant, les valeurs de DL50 pour *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii* sont 10 à 20 fois plus grandes chez la souris C 57BL/6 que chez la souris BALB/C.

En ce qui concerne la bactérie la moins virulente, les valeurs de DL50 sont au moins deux fois plus grandes chez la souris C57BL/6 que chez BALB/C.

Il n'a pas été noté de différences histologiques détectables entre les deux souches de souris.

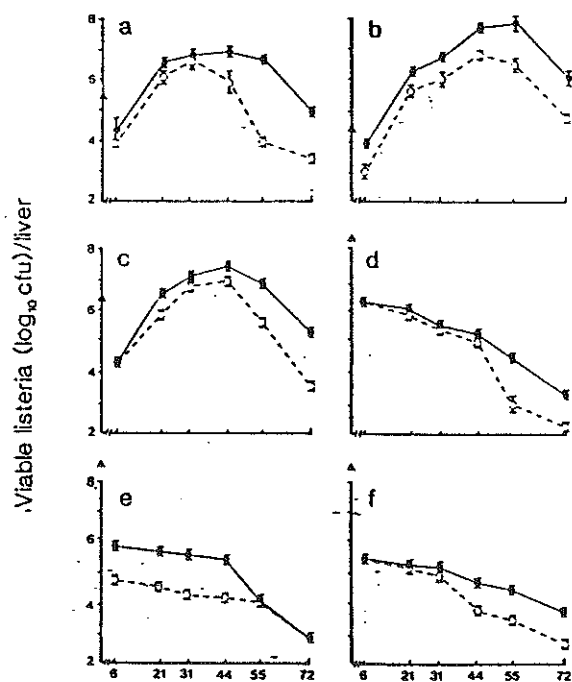


Figure 1 : Evolution de l'infection par *Listeria spp* dans le foie des souris C 57BL/6 (—○—) et BALBc (---□---) ; a) *Listeria monocytogenes* SLCC 2540 ; b) *Listeria monocytogenes* AB₁ ; c) *Listeria ivanovii* W 5379 ; d) *Listeria innocua* AB₆ ; e) *Listeria welshimeri* CIP 8149 ; f) *Listeria seeligeri* AB₂ (50)
 ▲ = inoculum bactérien

IV-3- LE MODELE CELLULAIRE

IV-3-1- CYTOTOXICITE

FARBER et al. ont utilisé des lignées cellulaires continues pour distinguer les espèces de *Listeria* pathogènes et non pathogènes (18).

Leur étude a montré que les souches de *Listeria monocytogenes* et *Listeria ivanovii*, étaient létales sur les souris. Les filtrats de culture étaient cytotoxiques pour les différentes sortes de cellules cultivées et hémolytiques pour les hématies de mouton.

L'effet cytolytique a été noté dans les minutes qui ont suivi l'addition de filtrats non dilués. Les cellules sont apparues granuleuses et les membranes cellulaires irrégulières ou rompues.

Huit cultures de cellules différentes ont été testées, et toutes étaient affectées de façon similaire cytolytiquement, mais de façon variée en sensibilité. La lignée cellulaire d'ovaire de Hamster Chinois est apparue la plus sensible.

Les souches de *Listeria innocua*, *Listeria grayi* et *Listeria murrayi* n'ont pas montré d'effet cytotoxique.

IV-3-2- ENTREE ET DEVENIR DE *LISTERIA* DANS LA CELLULE

Listeria monocytogenes est une bactérie intracellulaire facultative, qui chez son hôte mammifère peut infecter les entérocytes et phagocytes mononucléaires.

Il a été établi, il y a quelques temps par MACKANESS, que *Listeria monocytogenes* est capable de survivre et même de croître à l'intérieur des phagocytes professionnels, spécialement les macrophages (48).

Cependant, quoique d'importance cruciale, l'interaction de *Listeria monocytogenes* et des cellules phagocytiques professionnelles représente seulement une phase du processus infectieux entier.

La stratégie développée par *Listeria monocytogenes* in vivo inclue au moins deux étapes qui s'ajoutent : la pénétration dans l'hôte et l'invasion de tissus cibles tels que le système nerveux central et le placenta.

IV-3-2-1- Mécanismes d'entrée de *Listeria monocytogenes* dans le corps humain

Après inoculation intraveineuse d'une dose sublétales de *Listeria monocytogenes* chez la souris, les bactéries disparaissent du sang dans les 5 minutes (48).

Il est actuellement évident que l'intestin est le site usuel d'entrée de *Listeria monocytogenes*.

De récentes épidémies de listeriose ont clairement montré qu'elles étaient associées à l'ingestion de nourriture contaminée, principalement par des produits laitiers avec des symptômes gastro-intestinaux fréquemment rencontrés (20,44,81).

Des animaux inoculés avec *Listeria monocytogenes* par voie orale ont développé une maladie systémique avec une propagation bactérienne dans le foie et la rate (4,47).

Cependant, il existe d'autres données au sujet du site primaire d'invasion des tissus intestinaux par *Listeria monocytogenes*.

RACZ et al. ont montré par des études en microscopie électronique que l'administration orale de *Listeria monocytogenes* chez le Cobaye avait pour résultat l'infection des cellules épithéliales de façon prédominante dans le petit intestin (67).

Au contraire, MAC DONALD et CARTER ont trouvé que *Listeria monocytogenes* donnée oralement aux souris avait pénétrée dans les plaques de PEYER et non dans l'intestin grêle (47).

De par ces résultats, deux hypothèses distinctes ont été faites au sujet du mode d'entrée de *Listeria monocytogenes* :

- 1) *Listeria monocytogenes* est un parasite intracellulaire répandu, capable de pénétrer normalement les cellules non phagocytaires, spécialement les cellules épithéliales et de croître à l'intérieur de ces cellules.

Dans cette hypothèse, la cellule épithéliale n'est pas seulement un site d'entrée, mais aussi un site de réplication bactérienne.

Listeria monocytogenes a donc ainsi une opportunité supplémentaire de détruire la capacité bactéricide des macrophages.

Ce modèle est soutenu par l'observation que des épithéliums autres que celui de l'intestin peuvent être impliqués comme des sites initiaux de pénétration.

En étudiant des cystites, des kératoconjonctivites et des pneumonies listériennes chez des animaux expérimentaux, RACZ et al. ont trouvé que *Listeria monocytogenes* entrait dans l'épithélium cornéen, conjonctif, bronchique et urinaire.

Listeria monocytogenes se réplique librement à l'intérieur des cellules épithéliales, avant d'être capturée par des macrophages (66,67,68).

2) MAC DONALD et CARTER ont proposé un mode complètement différent d'invasion de *Listeria monocytogenes* dans le tissu intestinal (47).

Pour ces auteurs, *Listeria monocytogenes* pourrait utiliser des cellules absorbantes spécialisées de l'épithélium des plaques de Peyer, nommées cellules M, pour traverser la barrière épithéliale intestinale.

Dans ce modèle, les bactéries ne subissent pas de réplication significative à l'intérieur des cellules absorbantes. Elles sont promptement phagocytées par les macrophages, intimement associés avec les cellules M.

En conséquence, la propagation bactérienne dépend seulement de la capacité de *Listeria monocytogenes* de croître à l'intérieur des macrophages.

Le transport de *Listeria monocytogenes* par les cellules M n'est pas encore bien établi. Cependant, ces cellules connues pour transformer les antigènes intestinaux solubles, pour la reconnaissance immunitaire, sont capables de phagocytose de procaryotes intacts (61,100).

D'autre part, les réovirus trouvent un sentier à travers la barrière intestinale en utilisant les cellules M (100), et cette stratégie peut être employée par d'autres agents infectieux, dont les bactéries.

IV-3-2-2- Modèle d'infection in vitro d'une lignée cellulaire enterocyte-like cultivée

GAILLARD et al. ont utilisé la lignée cellulaire d'un carcinome de colon humain : Caco2, afin d'étudier la capacité de *Listeria monocytogenes* d'entrer dans les cellules épithéliales intestinales et de s'y répliquer intracellulairement.

Ces cellules Caco2 ont la propriété remarquable d'exprimer une différenciation entérocytique typique dans des conditions standards (64).

La lignée cellulaire Caco2 a été fournie par ZWEIBAUM A. et ROUSSET M. (Unité Inserm U178,94807 Villejuif Cédex).

Les résultats ont montré que *Listeria monocytogenes* était capable d'envahir les cellules Caco2 entérocyte like, probablement en induisant sa propre phagocytose.

Listeria monocytogenes s'est multiplié facilement à l'intérieur des cellules Caco2, avec un temps de génération apparent d'environ 1 heure.

La réplication à l'intérieur des cellules Caco2 dépend de la sécrétion de listeriolyse O. Ceci est prouvé par le fait qu'un mutant non hémolytique, obtenu de *Listeria monocytogenes* par transposon-mutagenèse (22) ne passe pas par une réplication intracellulaire significative, bien qu'il ait été normalement phagocyté.

Ceci est la première démonstration d'un rapport direct entre la production d'hémolysine (listeriolyse O) et la croissance intracellulaire de *Listeria monocytogenes*.

Les études en microscopie électronique de l'infection des cellules Caco2 entérocyte-like par *Listeria monocytogenes* ont confirmé entièrement les résultats de RACZ et al. dans l'entérite à *Listeria* expérimentale (67).

Il apparaît donc que l'entérocyte est probablement une cellule cible majeure pour l'entrée de *Listeria monocytogenes* dans l'hôte.

La mise en jeu des entérocytes dans l'initiation du processus infectieux est confortée par l'observation que les espèces non pathogènes du genre *Listeria* (*Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*) n'envahissent pas les cellules Caco2 entérocyte-like.

Il est vraisemblable que ces espèces ne sont pas responsables d'infections humaines (78) car elles sont incapables d'envahir les tissus de l'hôte.

IV-3-2-3- Croissance de *Listeria monocytogenes* à l'intérieur des macrophages

Les mécanismes contribuant à la réplication de *Listeria monocytogenes* à l'intérieur des macrophages sont difficiles à analyser, à cause de l'activité bactéricide drastique des cellules phagocytiques professionnelles.

Une étude récente in-vivo, utilisant un mutant-transposon non hémolytique de *Listeria monocytogenes*, a clairement montré que la sécrétion de l'hémolysine (listeriolysine O) est essentielle à la croissance bactérienne dans les tissus de l'hôte, où les bactéries sont piégées par les cellules phagocytiques professionnelles (22).

Cependant, bien qu'un modèle attractif de réplication intracellulaire de *Listeria monocytogenes* ait été proposé (22), les mécanismes par lesquels l'hémolysine agit restent hypothétiques.

KATHARIOU et al. (35), par mutagenèse de transposon, ont généré des mutants bactériens non hémolytiques (Hly⁻) qu'ils ont identifiés et caractérisés. Tous les mutants Hly⁻ étaient dénués d'une protéine extracellulaire majeure, d'un poids moléculaire apparent de 58 Kd, considérée être l'hémolysine. In vivo, les études utilisant le système d'infection murin, développé par MACKANESS (48) ont montré que les mutants Hly⁻ ont perdu la virulence qui caractérisait la souche parentérale.

Dans le but d'examiner la participation de l'hémolysine dans la survie intracellulaire de la bactérie, KATHARIOU et al. ont étudié les interactions de *Listeria monocytogenes* Hly⁺ et Hly⁻, avec les macrophages péritonéaux de souris.

En suivant une incubation initiale de 40 minutes, les bactéries qui restaient à l'extérieur des macrophages ont été tuées par de la gentamicine. Le nombre de bactéries viables à

l'intérieur des macrophages était alors déterminé (temps 0), aussi bien 3 heures et 6 heures après.

Dans les trois premières heures, le nombre de bactéries Hly⁺ et Hly⁻ a diminué de 50 % par rapport à celles présentes initialement (temps 0).

Après 3 heures à l'intérieur des macrophages, le nombre de Hly⁺ a commencé à augmenter, pour atteindre à 6 heures deux fois le nombre présent à l'origine.

Au contraire, les bactéries Hly⁻ ne se sont pas multipliées à l'intérieur des macrophages, et leur nombre a décliné régulièrement, de telle façon qu'à 6 heures, seulement 20% des bactéries présentes au temps 0 restaient.

La capacité des bactéries à survivre et à se multiplier à l'intérieur des macrophages est sévèrement affaiblie chez les mutants Hly⁻. Cependant, les bactéries Hly⁺ et Hly⁻ sont identiques quant à leur capacité d'être internalisées par les phagocytes non professionnels.

Expérimentation personnelle :

**ETUDE DE LA VIRULENCE DE
SEROTYPES DE *LISTERIA*
MONOCYTOGENES ET D' AUTRES
ESPECES DE *LISTERIA* DANS
L'INFECTION EXPERIMENTALE CHEZ
LA SOURIS**

I- INTRODUCTION

Le but de notre étude a été de tester la virulence de plusieurs souches sauvages de *Listeria* isolées d'aliments et de listerioses animales au Laboratoire Départemental Vétérinaire et de Recherche de la Haute-Vienne.

Les souches sont représentées par les cinq principales espèces de *Listeria* : *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*.

Quatre sérovars de *Listeria monocytogenes* ont été comparés (4b, 1/2a, 1/2b, 1/2c).

Nous avons pris comme modèle expérimental la souris Swiss infectée en intrapéritonéale par une dose appropriée de *Listeria*.

Les différents critères de virulence étudiés ont été le taux de mortalité des animaux, la colonisation des organes et la présence de germes dans le cerveau. L'existence ou non d'une hémolysine a été recherchée.

Une étude statistique a permis de comparer la virulence des différentes espèces de *Listeria*, des différents sérovars de *Listeria monocytogenes*, et des différentes souches appartenant au même sérovar de *Listeria monocytogenes*.

Ces résultats ont mis en évidence l'importance du sérotype de *Listeria monocytogenes* dans la virulence, en relation avec sa fréquence d'isolement en pathologie.

II- MATERIEL ET METHODES

II-1- SOUCHES BACTERIENNES ET PREPARATION DE L'INOCULUM

Les souches utilisées et leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 1.

Les bactéries sont cultivées sur trypticase soja agar (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) et conservées à 4°C.

Avant les expérimentations, la virulence des souches infectantes est rétablie par un passage sur souris.

Les souches sont ensuite cultivées dans un bouillon Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, Detroit, Mick) à 37°C pendant 18 heures.

Les cellules sont centrifugées (6 000 x g pendant 15 mn), mises en suspension dans de l'eau physiologique stérile (8.5 ‰), lavées deux fois et ramenées avec l'eau physiologique au même volume initial donnant 10^9 CFU/ml. L'inoculum est ajusté à 2.10^6 CFU/ml.

Souches	Espèces	sérovars a	origines
31386	<i>Listeria monocytogenes</i>	4b	Chaire de truite
362	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Avorton ovin
24631	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	Côte d'agneau
23185	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	Fromage
3670	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Steak haché surgelé
28607	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Lait de vache
2143	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Steak haché surgelé
27795	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	Steak haché surgelé
2141	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	Steak haché surgelé
4133	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	Steak haché surgelé
P1	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	Steak haché surgelé
28423	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	Steak haché surgelé
94415	<i>L. ivanovii</i>	5	Cerveau d'agneau
94669	<i>L. ivanovii</i>	5	Avorton ovin
55009	<i>L. seeligeri</i>	3b	Eau
26033	<i>L. seeligeri</i>	1/2b	Laiterie
20878	<i>L. welshimeri</i>	6a	Côte de porc
21070	<i>L. welshimeri</i>	6b	Echine de porc
2138	<i>L. innocua</i>	6a	Steak haché surgelé

a) Les sérovars des souches sauvages ont été déterminés au Centre National de Référence des *Listeria* (C.H.R Nantes).

Tableau 1 : Souches de *Listeria* spp. testées

II-2- L'HEMOLYSINE

Le Camp-test a été réalisé sur base de gélose au sang avec 5% d'érythrocytes de mouton selon la méthode de BRZIN et SEELIGER avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*.

II-3- INOCULATION DES SOURIS

Des souris swiss femelles de 18 à 20 g ont été utilisées, provenant de l'élevage DEPRE (Saint Doulchard, France).

Elles ont été alimentées avec des gâteaux prêts à l'emploi (Extralabo, Longueville, France) et ont eu de l'eau à volonté.

Les inoculations ont été pratiquées 48 heures après la réception des souris. Ce temps a été considéré comme suffisant pour adapter les souris à leur environnement.

Chaque souris a été inoculée par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml de l'inoculum soit 10^6 CFU par souris à l'aide d'une seringue à tuberculine de 1 ml montée d'une aiguille 12-4,5 mm. Les souris témoins ont été inoculées par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml d'eau physiologique stérile.

Deux expérimentations ont été réalisées :

Dans la première expérimentation, 9 lots de 20 souris ont été infectés respectivement par les 9 souches : 31386, 362, 3670, 28607, 2143, 27795, 2141, 4133 et 2138.

Dans la seconde expérimentation, 11 lots de 15 souris ont été infectés respectivement par 11 souches : 362, 24631, 23185, P1, 28423, 94415, 94669, 55009, 26033, 20878 et 21070.

II-4- DENOMBREMENT DES BACTERIES DANS LES ORGANES

Après 72 heures, les souris encore vivantes ont été tuées par dislocation cervicale.

Après injection de 2,0 ml de RPMI 1640 (Labysystems France, Les Ulys, France) dans la cavité péritonéale, le liquide de lavage péritonéal a été prélevé et dilué en série dans de l'eau physiologique stérile.

Les dilutions appropriées à raison de 10 ont été étalées sur gélose trypticase soja.

Les foies et les rates ont été prélevés et pesés stérilement.

Les organes ont été homogénéisés avec de l'eau physiologique stérile dans des broyeurs en verre séparés.

Des dilutions de raison 10 des homogénats ont été étalées sur trypticase soja agar.

Toutes les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures, puis les colonies ont été dénombrées.

Les résultats ont été donnés comme la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (SEM) en log 10 de *Listeria* viables par 0,1 ml de liquide de lavage péritonéal ou par gramme d'organe (10 à 20 souris par souche et, 30 à 70 souris par sérovar de *Listeria monocytogenes* et par espèces de *Listeria*).

Dans la seconde expérimentation, les cerveaux ont été prélevés stérilement, homogénéisés dans 20 ml de bouillon tryptose (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md) : 0,1 ml a été ensemencé sur gélose trypticase soja agar pendant 24 à 48 heures à 37°C et 1.0 ml a été enrichi dans 9.0 ml de bouillon tryptose pendant 7 jours à 30°C. Le pourcentage d'homogénats positifs en *Listeria* a été calculé.

II-5- EVALUATION STATISTIQUE

Les différences entre les moyennes ont été analysées comme significatives par le test t de Student's après analyse de la variance.

Les différences avec $p < 0,05$ ont été considérées comme significatives.

III- RESULTATS

III-1- HEMOLYSINE

Comme le montre le tableau 2, les quatre souches sauvages de *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a n'ont pas donné les mêmes résultats.

Deux souches sont faiblement hémolytiques : les deux autres sont fortement hémolytiques comme les autres souches de *Listeria monocytogenes*, de *Listeria ivanovii* et de *Listeria seeligeri*.

III-2- MORTALITE DES SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE *LISTERIA*

La dose inoculée de 10^6 CFU par souris a été choisie parce qu'elle a permis une colonisation maximum des organes, après 72 heures d'infection, avec les souches les plus pathogènes.

D'ailleurs, au cours des deux expérimentations, quelques animaux sont morts avant 72 heures.

Ainsi, l'inoculation de la souche 23185 de sérovar 1/2b a entraîné la mort d'une souris sur quinze, l'inoculation de la souche 362 serovar 4b a tué une souris sur vingt dans la première expérimentation et cinq souris sur quinze dans la seconde.

Tableau 2 : Effets de l'injection de 10⁶ CFU de différentes souches de *Listeria*

Souches	espèces	Sérovar	Hémolyse	Liquide de lavage péritonéal			Rate		Foie	
				Positif (%)	nombre de germes a	Foie b	Positif (%)	nombre de germes c	Positif (%)	nombre de germes c
31386 d	<i>Listeria monocytogenes</i>	4b	+	80	1,81 ± 0,31	0,194 ± 0,012 k	100	6,80 ± 0,19	100	5,91 ± 0,22
362 d	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	79	2,34 ± 0,34	0,176 ± 0,008 l	95	6,89 ± 0,27	95	6,56 ± 0,24
362 a	<i>L. monocytogenes</i>	4b	+	90	3,50 ± 0,74	0,157 ± 0,024	100	7,70 ± 0,49	100	6,66 ± 0,51
24631 a	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+	20	0,84 ± 0,38 h	0,209 ± 0,018 j	100	5,12 ± 0,23 h	100	3,86 ± 0,42 h
23185 a	<i>L. monocytogenes</i>	1/2b	+	93	3,18 ± 0,48	0,183 ± 0,017 i	100	7,09 ± 0,28	100	6,31 ± 0,29
3670 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	100	2,50 ± 0,25	0,191 ± 0,011 i	100	6,93 ± 0,21	100	5,91 ± 0,23
28607 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	95	2,23 ± 0,20	0,184 ± 0,011 i	100	7,00 ± 0,29	100	6,01 ± 0,31
2143 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	0	0 h	0,133 ± 0,007	0	0 h	0	0 h
27795 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	+	0	0 h	0,116 ± 0,008 k	10	0,27 ± 0,18 h	5	0,11 ± 0,11 h
2141 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	+	95	1,12 ± 0,18 h	0,190 ± 0,014 k	95	5,24 ± 0,32 g	95	3,93 ± 0,30 g
4133 d	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	+	70	0,98 ± 0,20 h	0,189 ± 0,011 k	100	5,61 ± 0,16 h	100	4,33 ± 0,22 g
P1 a	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	+	67	1,02 ± 0,25 h	0,191 ± 0,016 k	100	5,98 ± 0,20 i	100	4,27 ± 0,19 g
28423 a	<i>L. monocytogenes</i>	1/2c	+	93	2,81 ± 0,28	0,172 ± 0,019	100	6,68 ± 0,24	100	5,28 ± 0,24
94415 a	<i>L. ivanovi</i>	5	+	7	0,07 ± 0,07	0,182 ± 0,011	27	0,72 ± 0,32 h	47	1,43 ± 0,45
84668 a	<i>L. ivanovi</i>	5	+	33	0,83 ± 0,29	0,151 ± 0,009	87	3,58 ± 0,46	67	1,79 ± 0,35
55009 a	<i>L. seeligeri</i>	3b	+	0	0	0,181 ± 0,009	0	0	0	0
28033 a	<i>L. seeligeri</i>	1/2b	+	0	0	0,157 ± 0,008	0	0	0	0
28678 a	<i>L. weishimeti</i>	6a	+	27	0,58 ± 0,28	0,195 ± 0,011	0	0	0	0
21070 a	<i>L. weishimeti</i>	6b	+	20	0,28 ± 0,17	0,150 ± 0,006	0	0	7	0,15 ± 0,15
2138 d	<i>L. innocua</i>	6a	+	0	0	0,118 ± 0,007 i	5	0,13 ± 0,13 i	10	0,24 ± 0,16
Control				0	0	0,142 ± 0,007	0	0	0	0

a) Moyenne ± ESM Log₁₀ CFU *Listeria* /0,1ml de liquide de lavage péritonéal

b) Moyenne ± ESM par gramme de rate

c) Moyenne ± ESM Log₁₀ CFU *Listeria* / gramme d'organe (foie et rate)

d) Souches utilisées dans la première expérimentation.

e) Souches utilisées dans la deuxième expérimentation.

f) P<0,05 par rapport à la plus haute moyenne obtenue avec la souche appartenant au même sérovar.

g) P<0,01 par rapport à la plus haute moyenne obtenue avec la souche appartenant au même sérovar.

h) P<0,001 par rapport à la plus haute moyenne obtenue avec la souche appartenant au même sérovar.

i) P<0,05 par rapport aux témoins.

j) P<0,01 par rapport aux témoins.

k) P<0,001 par rapport aux témoins.

Weakly = faiblement

III-3- DETERMINATION DU NOMBRE DE *LISTERIA* DANS LE LIQUIDE DE LAVAGE PERITONEAL 72 H APRES L'INFECTION.

La moyenne des CFU en log 10 de *Listeria* par 0,1 ml de liquide de lavage péritonéal a été calculée pour chaque espèce (fig. 1), chaque sérovar de *Listeria monocytogenes* (fig. 1) et pour chaque souche (tableau 2).

Listeria innocua et *Listeria seeligeri* n'ont pas été retrouvées dans la cavité péritonéale.

Listeria ivanovii et *Listeria welshimeri* ont été isolées sur seulement quelques souris et cela en très faible quantité.

Pour *Listeria monocytogenes*, sauf pour les deux souches sérovars 1/2a faiblement hémolytiques (wh) et la souche 24631 sérovar 1/2b, toutes les souches ont été réisolées à partir du liquide de lavage péritonéal et dénombrées à des taux élevés.

Pour ces trois dernières souches, les bactéries ont été rapidement éliminées de la cavité péritonéale comme c'est le cas pour les autres espèces de *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* et *Listeria ivanovii*. D'autre part, la souche 28423, *Listeria monocytogenes* serovar 1/2c, est retrouvée dans le liquide de lavage péritonéal à un taux moyen statistiquement supérieur aux trois autres souches appartenant à ce même sérovar avec $p < 0,001$ (tableau 2).

Sur la figure 1, nous montrons que *Listeria monocytogenes* sérovars 1/2c et 1/2a wh, *Listeria ivanovii*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* et *Listeria innocua* présentent des différences significatives avec le sérovar 4b ($p < 0,001$) dans leur taux moyen de *Listeria* dénombré à partir du liquide de lavage péritonéal.

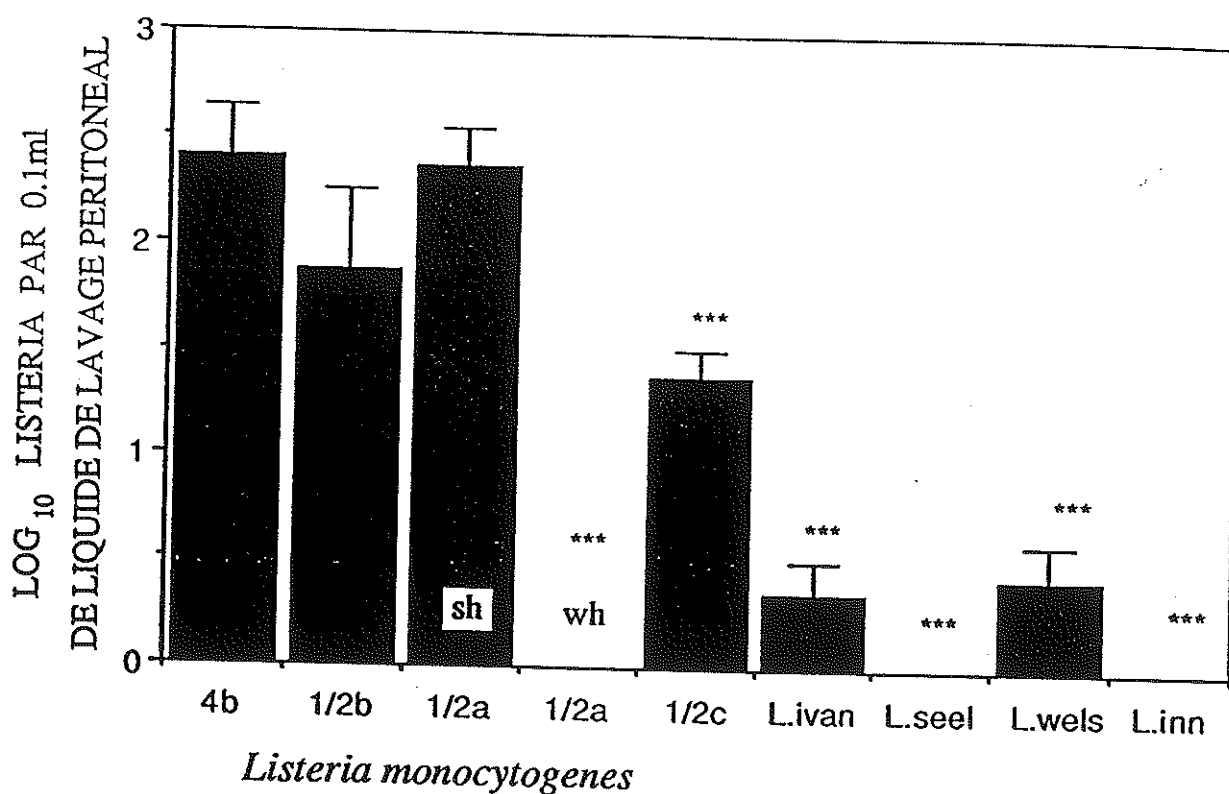


Figure 1 : Présence de *Listeria ivanovii* (L. ivan), *Listeria seeligeri* (L. seel), *L. welshimeri* (L. wels), *Listeria innocua* (L. inn) et des différents sérovars de *Listeria monocytogenes* dans la cavité péritonéale 72 heures après injection intraperitonéale de 10^6 *Listeria* par souris.

Listeria monocytogenes serovar 1/2a a été divisé en deux groupes : un fortement hémolytique (sh), l'autre faiblement hémolytique (wh).

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart standard à la moyenne en log₁₀ de *Listeria* par 0,1 ml de liquide de lavage péritonéal.

Le symbole *** montre une différence significative avec la valeur pour *Listeria monocytogenes* serovar 4b $p < 0,001$.

III-4- VARIATION DU POIDS DE LA RATE EN FONCTION DE LA SOUCHE INOCULEE (Figure 2)

72 heures après l'injection, la plupart des souches de *Listeria monocytogenes* ont entraîné une augmentation significative du poids de la rate par rapport au lot témoin (tableau 2). Au contraire le poids des rates des animaux infectés par *Listeria innocua* et *Listeria monocytogenes* sérovar 1/2a w.h est inférieur à celui du lot témoin (tableau 2).

Comme le montre la figure 2, l'inoculation des deux espèces pathogènes de *Listeria* : *Listeria ivanovii* et *Listeria monocytogenes*, provoque une augmentation significative du poids de la rate par rapport au contrôle témoin, à l'exception de *Listeria monocytogenes* sérovar 1/2a w.h.

III-5- DETERMINATION DU NOMBRE DE *LISTERIA* PAR GRAMME DE FOIE ET DE RATE EN FONCTION DES SOUCHES INOCULEES

Le dénombrement des bactéries dans le système réticulo-endothélial, 72 heures après l'injection, est représentatif de la virulence des *Listeria* en fonction de la souche inoculée.

Dans un premier temps, nous avons comparé l'intensité de la colonisation des deux organes, foie et rate, pour toutes les souches.

On constate que la rate est toujours plus colonisée que le foie, à l'exception de la souche 94415 de *Listeria ivanovii* et des souches de *Listeria welshimeri* (tableau 2).

Dans un deuxième temps, nous avons comparé le pourcentage d'organes colonisés par lot de souris : *Listeria monocytogenes* est présente dans au moins 95% des organes, sauf pour les deux souches serovar 1/2 a wh. *Listeria ivanovii* est présente à des taux variables en fonction de la souche et de l'organe.

Pour les autres espèces de *Listeria*, considérées comme non pathogènes, le pourcentage est très faible ou nul (tableau 2).

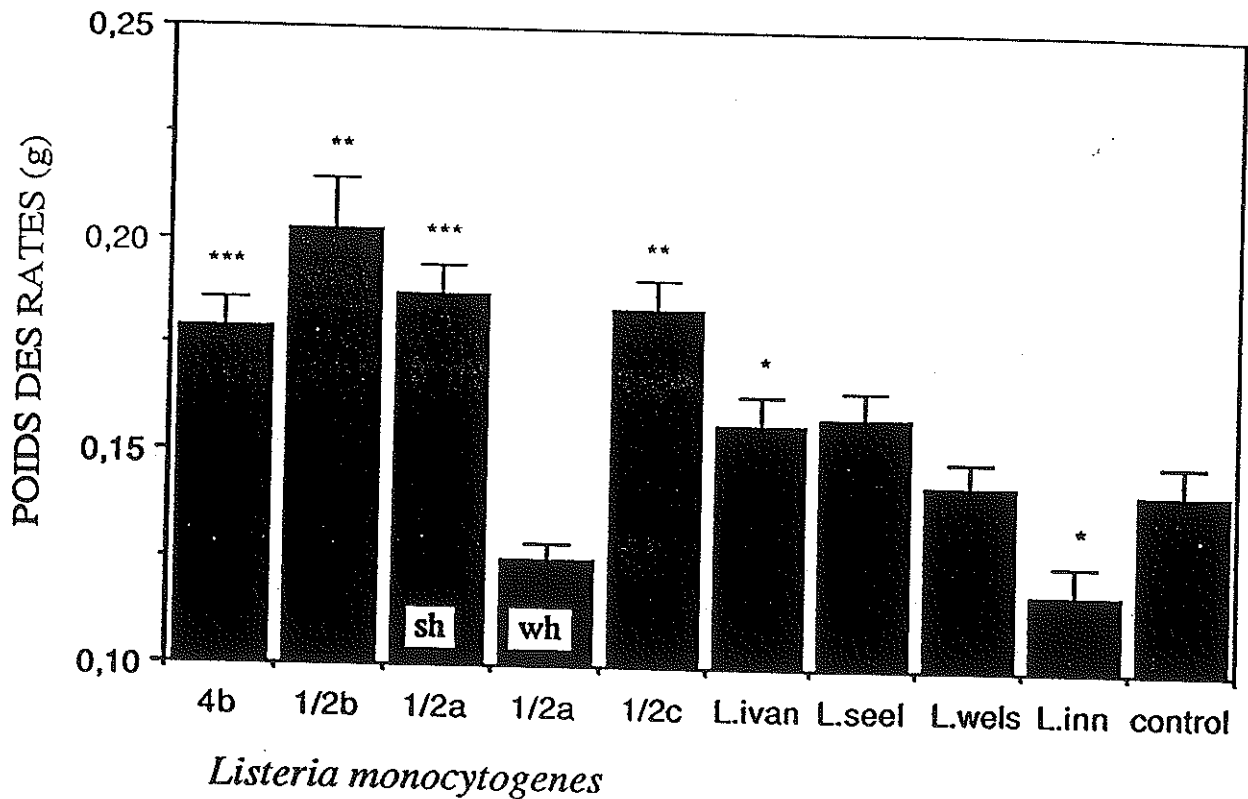


Figure 2 : Les effets de *Listeria ivanovii* (L. ivan), *Listeria seeligeri* (L. seel), *Listeria welshimeri* (L. wels), *Listeria innocua* (L. inn) et différents sérovares de *Listeria monocytogenes* 72 heures après injection intraperitonéale de 10^6 *Listeria* par souris sur le poids des rates.

Listeria monocytogenes serovar 1/2a a été divisé en deux groupes : un fortement hémolytique (sh), l'autre faiblement hémolytique (wh).

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart standard par g. de rate (30 à 70 souris par groupe) à chaque sérovar ou espèce.

Les symboles *, **, *** montrent une différence significative avec la valeur du contrôle $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivement.

Dans un troisième temps, nous avons mis en évidence des différences de virulence entre les souches appartenant à un même sérovar.

Pour *Listeria monocytogenes* sérovar 1/2b, la souche 23185 colonise statistiquement plus les organes que la souche 24631 ($p < 0,001$).

Pour le sérovar 1/2a, les deux souches wh sont pratiquement absentes des organes par rapport aux deux souches sh.

Enfin, pour *Listeria ivanovii*, la souche 94669 est plus fréquemment isolée que la souche 94415.

Le profil des deux diagrammes (figure 3 et figure 4) est très semblable. Il permet de distinguer trois types de résultats :

- 1) Les bactéries qui sont présentes à une forte concentration dans les organes (*Listeria monocytogenes* sérovats 4b, 1/2b, 1/2a sh, 1/2c) ;
- 2) Celles comme *Listeria ivanovii* qui colonise les organes d'une manière moins importante que les précédentes ;
- 3) Et enfin celles qui sont absentes ou très faiblement présentes dans les organes (*Listeria monocytogenes* 1/2a wh, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria innocua*).

Les résultats statistiques nous permettent de constater que, pour une même dose initiale d'injection de 10^6 CFU de *Listeria* par souris, certaines bactéries se sont multipliées dans l'organisme des animaux avec une intensité proportionnelle à leur virulence.

Par contre, d'autres bactéries ont été éliminées d'une manière plus ou moins importante.

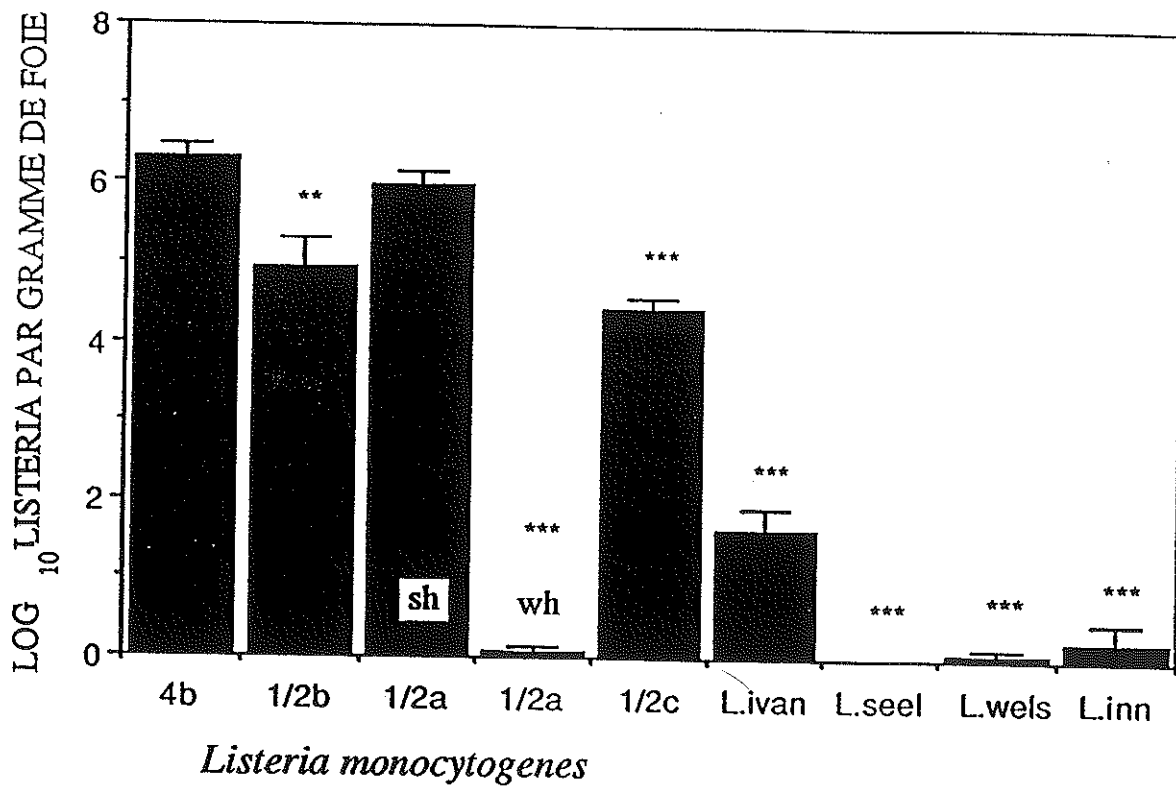


Figure 3 : Croissance de *Listeria ivanovii* (L. ivan), *Listeria seeligeri* (L. seel), *Listeria welshimeri* (L. wels), *Listeria innocua* (L. inn) et différents sérovars de *Listeria monocytogenes* par gramme de foie 2 heures après injection intraperitonéale de 10^6 *Listeria* par souris.

Listeria monocytogenes serovar 1/2a a été divisé en deux groupes : un fortement hémolytique (sh), l'autre faiblement hémolytique (wh).

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart standard en log 10 de *Listeria* par g. de foie (30 à 70 souris par groupe) à chaque sérovar ou espèce. Les symboles **, *** montrent une différence significative avec la valeur de *Listeria monocytogenes* serovar 4 b avec $p < 0,01$.

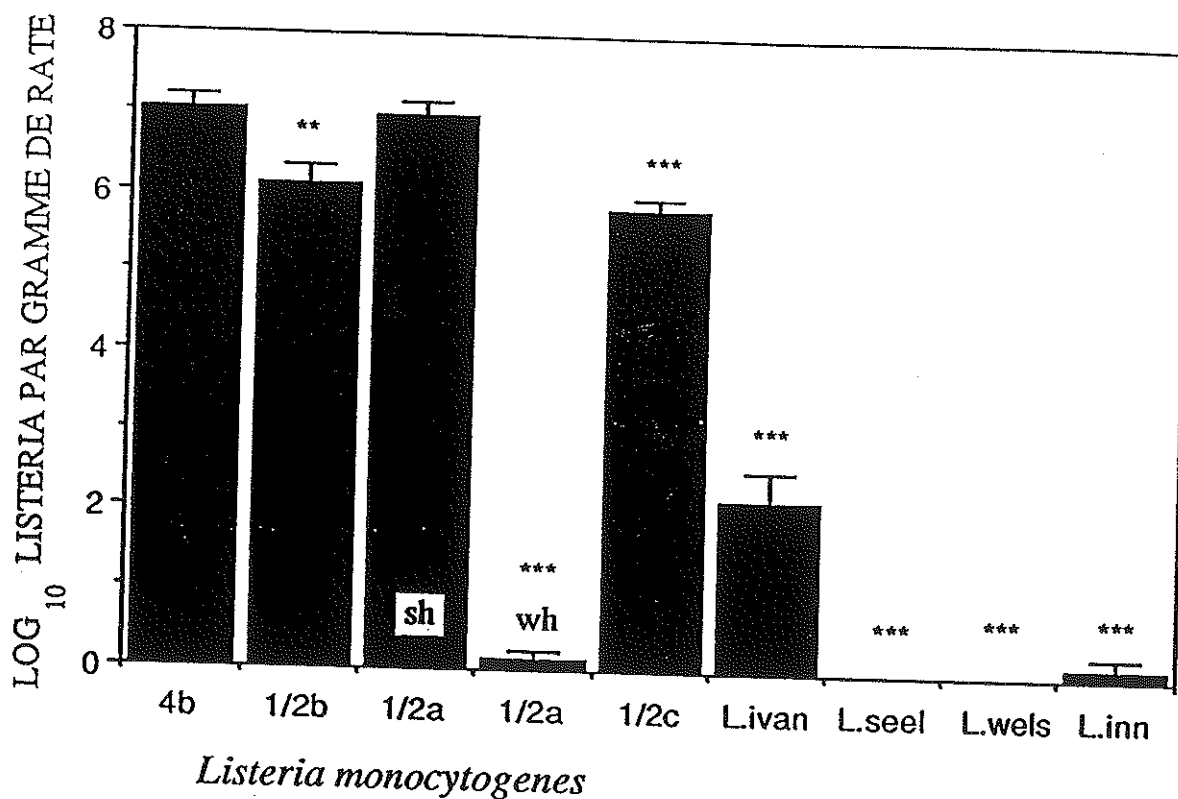


Figure 4 : Croissance de *Listeria ivanovii* (L. ivan), *Listeria seeligeri* (L. seel), *Listeria welshimeri* (L. wels), *Listeria innocua* (L. inn) et différents sérovars de *Listeria monocytogenes* par gramme de rate 72 heures après injection intraperitonéale de 10^6 *Listeria* par souris.

Listeria monocytogenes serovar 1/2a a été divisé en deux groupes : un fortement hémolytique (sh), l'autre faiblement hémolytique (wh).

Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart standard en log 10 de *Listeria* par g. de rate (30 à 70 souris par groupe) à chaque sérovar ou espèce. Les symboles **, *** montrent une différence significative avec la valeur de *Listeria monocytogenes* serovar 4 b avec $p < 0,01$, $p < 0,001$ respectivement.

III-6- RECHERCHE DE *LISTERIA* DANS LES CERVEAUX APRES 24 à 48 HEURES à 37°C ET 7 JOURS D'INCUBATION à 30°C.

Dans la deuxième expérimentation seulement, les bactéries ont été recherchées à partir d'homogénats de cerveaux.

Listeria ivanovii, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* et *Listeria innocua* n'ont jamais été décelées même après 7 jours d'enrichissement à 30°C.

Par contre, les cinq souches de *Listeria monocytogenes* ont été isolées, mais avec une grande variabilité. Le sérovar 4b est retrouvé dans 60% des homogénats sur gélose et dans 80% après enrichissement.

La présence du sérovar 1/2b dans le cerveau varie selon la souche : la souche 23185 est isolée dans 50% des cas sur gélose et dans 57% des cas après enrichissement. Par contre, la souche 24631 1/2b n'a été isolée après enrichissement que dans un homogénat sur quinze.

Les deux souches sérovar 1/2c ont été mises en évidence sur gélose dans 13% des cerveaux. Après enrichissement, la souche P1 a été isolée dans 1/3 des cas et la souche 28423 dans les 2/3 des cas.

La présence des *Listeria monocytogenes* dans le cerveau après une injection intrapéritonéale confirme le tropisme de cette espèce pour cet organe.

IV- DISCUSSION

L'injection en intrapéritonéale sur la souris d'une dose constante de *Listeria*, préparée à partir de différentes souches sauvages isolées d'aliments, a permis de différencier la virulence entre les espèces, et les sérovars de *Listeria monocytogenes*.

Les différents tests utilisés ont montré une homogénéité dans l'expression des résultats.

En effet, l'existence d'une hémolysine, l'augmentation du poids de la rate, le nombre élevé de bactéries dans le liquide de lavage péritonéal dans le foie et la rate, la présence de germes dans le cerveau, ont permis de caractériser les souches les plus virulentes.

En accord avec les travaux de WIRSING VON KONIG et al. (99), nous avons montré que le sérovar 4b de *Listeria monocytogenes* est le plus virulent. Pour ce sérovar, la souche 31386 isolée d'un aliment est aussi virulente que la souche 362 isolée d'une pathologie animale.

En accord avec la littérature (99), nous confirmons que le sérovar 1/2b est moins virulent que le sérovar 4b. Néanmoins, pour ce sérovar 1/2b, la souche 24631 colonise moins les organes que la souche 23185.

Les quatre souches sérovar 1/2a ont donné deux types de résultats : les deux souches sh, 3670 et 28607, sont aussi virulentes que les souches du sérovar 4b. La souche 28607 a été isolée du lait d'une vache qui ne présentait aucun signe clinique de listériose. La composition de ce lait était normale, excepté un taux leucocytaire élevé. Cet exemple est très représentatif d'une contamination par porteurs sains dans l'industrie laitière.

Les deux souches w.h, 27795 et 2143 ne sont pas virulentes sur la souris. HOF (29) avait déjà décrit l'existence d'une souche de sérovar 1/2a non hémolytique et avirulente. Dans notre laboratoire, sur 23 souches sauvages sérovar 1/2a que nous avons isolées à partir d'aliments, 11 sont faiblement hémolytiques.

Pour le sérovar 1/2c, les quatre souches sauvages que nous avons utilisées, ont été isolées de produits carnés. Elles sont moins virulentes sur la souris que le sérovar 4b et ce, de façon significative.

Cependant, la souche 28423 est plus virulente que les trois autres.

Nous avons montré qu'in-vivo, et après injection en intrapéritonéale, les deux souches sauvages de *Listeria ivanovii* sont beaucoup moins virulentes que les souches de *Listeria monocytogenes* hémolytiques. Ces résultats sont analogues à ceux obtenus en intraveineuse chez la souris par HOF et al. (30).

Des différences de virulence entre ces deux espèces ont été aussi observées in-vitro par certains auteurs . Ainsi, bien qu'elles soient toutes les deux cytotoxiques (18) et capables d'envahir des cellules non phagocytaires (21), comme les cellules Caco2, seule *Listeria monocytogenes* peut pénétrer des cellules embryonnaires de souris, telles les cellules 3T6 (39).

Les tests de virulence que nous avons effectués sur la souris confirment la non virulence de *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri* et de *Listeria seeligeri* malgré l'existence d'une hémolysine chez cette dernière espèce.

Tous ces paramètres étudiés sur la souris ont permis d'apprécier la bonne corrélation entre les résultats.

La virulence des *Listeria* est en relation directe avec le sérovar.

Si *Listeria monocytogenes* sérovar 4b est la plus virulente en pathologie, elle est peu isolée des aliments à la différence des sérovats 1/2a et 1/2c (56).

L'existence de souches sérovats 1/2a avirulentes wh explique que ce sérovar est moins impliqué en pathologie humaine. Pour le sérovar 1/2c, nos travaux ont montré qu'il est moins virulent que 4b, ce qui expliquerait sa faible responsabilité dans les listerioses humaines (49).

CONCLUSION

De cette étude sur la virulence des *Listeria* d'origine alimentaire nous tirons les réflexions suivantes :

* Les critères étudiés sont significatifs, la virulence aussi bien in-vitro avec l'hémolysine qu'in vivo sur la souris Swiss.

* S'il n'y a pas concordance statistique entre le nombre de *Listeria monocytogenes* sérotype 1/2a et 1/2c isolées des aliments de l'homme et le nombre de souches appartenant au sérotype 4b isolées à partir de cas pathologiques, ce phénomène peut s'expliquer par la non virulence d'un grand nombre de souches 1/2a et la plus faible virulence des souches de sérotype 1/2c.

BIBLIOGRAPHIE

- 1- ALOUF J.E.
Streptococcal toxins (streptolysin O, streptolysin S, erythrogenic toxins)
Pharmacol. Ther., 1980, 11, 661-717
- 2- AUDURIER A.
Listeria
In L. Le Minor, M. Veron (eds)
Bacteriol. Med. Flammarion, Paris, 1982, 559-569
- 3- AUDURIER A., PARDON P., MARLY J., FANTIER F.
Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1980, 131 B, 47-57
- 4- AUDURIER A., PARDON P., MARLY J., FANTIER F., LOULERGUE J.
Mesure de la virulence chez la souris de différentes bactéries appartenant au genre *Listeria*
Ann. Immunol. Inst. Pasteur, 1981, 132D, 191-200
- 5- AUDURIER A., ROCOURT J., COURTIEU A.
Isolement et caractérisation de bactériophages de *Listeria monocytogenes*
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1977, 128A, 185-198
- 6- BARRY T., POWELL R., GANNON F.
A general method to generate DNA probes for microorganisms
Biotechnology, 1980, 8, 233-236
- 7- BECKERS H.J., SOENTORO P.S.S., DELFOU-VAN-ASCH E.H.M.
The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat
Int. J. Food Microbiol., 1987, 4, 249-256
- 8- BERCHE P., GAILLARD J.L., SANSONETTI P., GEOFFROY C., ALOUF J.E.
Towards a better understanding of the molecular mechanisms of intracellular growth of *Listeria monocytogenes*
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1987, 138, 242-246
- 9- BORDER P.M., HOWARD J.J., PLASTOW G.S., SIGGENS K.W.
Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction
Letters in Applied Microbiology, 1990, 11, 158-162

- 10- BREER C.
Listeria in cheese
Vet. Med. Hefte., 1987, 5, 106-109
- 11- BROADENT D.W.
Listeria as a cause of abortion and neonatal mortality in sheep
Aust. Vet. J., 1972, 48, 391-394
- 12- COTTEREAU Ph., LAVAL A.
Les aspects cliniques de la listériose chez les animaux domestiques et de laboratoire
Bull. Soc. Sci. Vét. et Méd. comparée, Lyon, 1972, 74, n°6
- 13- COTTIN J., GENTHON H., BIZON C., CARBONNELLE B.
Recherche de *Listeria monocytogenes* dans des viandes prélevées sur 514 bovins
Sci. Alim., 1985, 5, 145-149
- 14- DOMINGUEZ RODRIGUEZ L., GARAYZABAL J.F.F., VASQUEZ BOLAND J.A.,
FERRI E.R., SUAREZ FERNANDEZ G.
Isolation de microorganismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la
consommation humaine
Can. J. Microbiol., 1985, 31, 938-941
- 15- DONKER-VOET J.
Listeria monocytogenes, some biochemical and serological aspects
Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1972, 19, 287-291
- 16- FARBER J.M., JOHNSTON M.A., PURVIS V., LOIT A.
Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp.
Int. J. Food. Microbiol., 1987, 5, 157-163
- 17- FARBER J.M., SANDERS G.W., MALCOM S.A.
The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario
Can. J. Microbiol., 1988, 34, 95-100
- 18- FARBER M., SPEIRS J.I.
Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and non
pathogenic *Listeria* spp.
J. Clin. Microbiol., 1987, 25, 8, 1463-1466

- 19- FINGER H., HEYMER B., WIRSING VON KOENIG C.H., HOF H.
Macrophage function in senescence
Gerontology 28., 1982, 223-232

- 20- FLEMING D.W., COCHI S.L., MAC DONALD K.L., BRONDUM J., HAYES P.S.,
PLIKAYTIS B.D., HOLMES M.B., AUDURIER A., BROOME C.V., REINGOLD A.L.
Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis
New Engl. J. Med., 1985, 312, 404-407

- 21- GAILLARD J.L., BERCHE P., MOUNIER P., RICHARD S., SANSONETTI P.
In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the
human enterocyte like CaCO₂
Infect. Immun., 1987, 55, 2822-2829

- 22- GAILLARD J.L., BERCHE P., SANSONETTI P.
Transposon mutagenesis as a tool to study the role of haemolysin in the virulence of
Listeria monocytogenes
Infect. Immun., 1986, 52, 50-55

- 23- GALSWORTHY S.B.
Role of the cell surface in virulence of *Listeria monocytogenes*
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1987, 138, 273-276

- 24- GALSWORTHY S.B., GUROFSKY S.M., MURRAY R.G.E.
Purification of a monocytosis producing activity from *Listeria monocytogenes*
Infect. immun., 1977, 10, 1105-1109

- 25- GARAYZABAL J.F.F., DOMINGUEZ RODRIGUEZ L., VASQUEZ BOLAND J.A.,
BLANCO CANELO J.L., SUAREZ FERNANDEZ G.
Listeria monocytogenes dans le lait pasteurisé
Can. J. Microbiol., 1986, 32, 149-150

- 26- GOEBEL W., KATHARIOU S., KUHN M., SOKOLOVIC Z., KREFT J., KOHLER
S., FUNKE D., CHAKRABORTY T., LEIMEISTER-WACHTER M.
Hemolysin from *Listeria*. Biochemistry, genetics and function in pathogenesis
Infection, 1988, 16, suppl. 2, 149-156

- 27- HEYMER B., WIRSING VON KÖNIG C.H., FINGER H., HOF H.,
EMMERLING P.
Histomorphology of experimental listeriosis
Infection, 1988, 16, 2, 106-111
- 28- HO J.L., SHANDS K.N., FRIEDLAND G., ECKIND P., FRASER D.W.
An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight
Boston hospitals
Arch. Intern. Med., 1986, 146, 520-524
- 29- HOF H.
Virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a
Med. Microbiol. Immunol., 1984, 173, 207-218
- 30- HOF H., HEFNER P.
Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species
Infection, 1988, 16, 2, 141-144
- 31- IVANOVI
Untersuchungen über die Listeriose der schafe in Bulgarien
Mh. Vet. Med., 1962, 17, 729-736
- 32- JENKINS E.M., NJOKU-OBI A.N., ADAMS E.W.
Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*
J. Bact., 1964, 88, 418-424
- 33- JONES D.
The place of *Listeria* among gram-positive bacteria
Infection, 1988, 16, suppl. 2
- 34- KAMPELMACHER E.H., VAN NOORLE JANLEN L.M.
Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals
Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig., 1969, 211, 353-359
- 35- KATHARIOU S., METZ P., HOF H., GOEBEL W.
Tn 916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria*
monocytogenes
J. Bact., 1987, 169, 1291-1297

- 36- KINGDON G.C., SWORD C.P.
Biochemical and immunological effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin
Infect. Immun., 1970, 1, 363-372
- 37- KINGDON G.C., SWORD C.P.
Cardiotoxic and lethal effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin
Infect. Immun., 1970, 1, 373-379
- 38- KRUGER W.
Das Vorkommen von *Listeria monocytogenes* in den verschiedenen silagen und dessen
ätiolo bedeutung
Arch. exp. Vet. Med., 1963, 17, 181-20
- 39- KUHN M., KATHARIOU S., GOEBEL W.
Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria
monocytogenes*
Infect. Immun., 1988, 56, 79-82
- 40- LARSEN H.E., SEELIGER H.P.R.
A mannitol fermenting *Listeria* : *Listeria grayi* sp.n.
Proceedings of the III Int. Symposium on listeriosis, Bilthoven, 1966
- 41- LE GUILLOUX M.
Listeria monocytogenes. Sa fréquence dans les produits de charcuterie
Bull. Soc. Vet. Prat. France, 1980, 64, 45-53
- 42- LEHNERT C.
Die Tenazität von *Listeria monocytogenes* in der Aussenwelt
Zbl. Bakt. 1. Abt. Orig., 1960, 350-356
- 43- LE MINOR LEON
Bacteriol. Med. Chapitre 33, 559-569
- 44- LINNAN M.J., MASCOLA L., XIAO D.L., GOULET V.
An investigation of listeriosis in southern California, 1985
In "Listeriose *Listeria*, Listeriosis, 1985-1986"
(COURTIEU A.L., ESPAZE E.P., REYNAUD A.E.)
Université de Nantes, 1986, p 227

- 45- LOVETT J., FRANCIS D.W., HUNT J.M.
Listeria monocytogenes in raw milk : detection, incidence and pathogenicity
J. Food. Protect., 1987, 50, 188-192
- 46- LOVIK M., NORTH R.J.
Effect of ageing on antimicrobial immunity : old mice display a normal capacity for generating T cells and immunologic memory in response to infection with *Listeria monocytogenes*
J. Immunol., 1985, 135, 3479-3486
- 47- MAC DONALD T.T., CARTER P.B.
Cell mediated immunity to intestinal infection
Infect. Immun., 1980, 28, 516-523
- 48- MACKANESS G.B.
Cellular resistance to infection
J. exp. Med., 1962, 116, 381-417
- 49- MAC LAUHLIN J.
Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis
Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1990, 9, 210-213
- 50- MAINOU-FOWLER T., MAC GOWAN A.P., POSTLETHWAITE R.
Virulence of *Listeria* spp : course of infection in resistant and susceptible mice
J. Med. Microbiol., 1988, 27, 131-140
- 51- MATTINGLY J.A., BUTMAN B.T., PLANK M.C., DURHAM R.J., ROBINSON B.J.
Rapid monoclonal antibody-based Enzyme Linked Immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products
J. Assoc. off. Anal. Chem., 1988, 71, 3, 679-681
- 52- MAUPAS P., PHILIPPON A., AUDURIER A., BORDERON E., BOULARD P.
Epidemiologie et pathogénie des listerioses
Sem. Hôp. Paris, 1971, 47, n° 43,44, 2475-2480

- 53- MURRAY E.G.D., WEBB R.A., SWANN M.B.R.
A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus : *bacterium monocytogenes* (sp.n)
J. Path. Bact., 1926, 29, 407-439
- 54- NEILANDS J.B.
Iron absorption and transport in microorganisms
Ann. Rev. Nutr., 1981, 1, 27-46
- 55- NICOLAS J.A.
La listeriose animale
Revue Méd. Vét., 1986, 137, 10, 645-650
- 56- NICOLAS J.A., VIDAUD N.
Contribution à l'étude des *Listeria* présentes dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine
Rev. Méd. Vét., 1987, 163, 283-285
- 57- NJOKU-OBI A.N., JENKINS E.M., NJOKU-OBI J.C., ADAMS J., COVINGTON V.
Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysin
J. Bact., 1963, 86, 1-8
- 58- NOTERMANS S., CHAKRABORTY T., LEIMEISTER-WACHTER M., DUFRENNE J., HEUVELMAN K.J., MAAS H., JANSEN W., WERNARS K., GUINEE P.
Specific gene probe for detection of biotyped and serotyped *Listeria* strains
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55, 4, 902-906
- 59- OLIVE D.M.
Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase
J. Clin. Microbiol., 1989, 27, 261-265
- 60- OTOKUNEFOR T.V., SHUM B.T., GALSWORTHY S.B.
Immunological properties of a partially purified monocytosis producing activity from *Listeria monocytogenes*
Can. J. Microbiol., 1979, 25, 706-712

- 61- OWEN R.L., PIERCE N.F., APPLE R.T., CRAY W.C.
M cell transport of vibrio cholerae from the intestinal lumen into Peyer's patches : a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration
J. Infect. Dis., 1986, 153, 1108-1118
- 62- PIFFARETTI J.C., KRESSENBUCH H., AESCHBACHER M., BILLE J.,
BANNERMAN E., MUSSER J.M., SELANDER R.K., ROCOURT J.
Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 3818-3822
- 63- PINI P.N., GILBERT R.J.
The occurrence in UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses
Int. J. Food Microbiol., 1988, 6, 317-326
- 64- PINTO M., ROBINE-LEON S., APPAY M.D.
Enterocyte like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line CaCO₂ in culture
Biol. Cell., 1983, 47, 323-330
- 65- PUNJABI C., GATSWORTHY S.B., KONGSHAVEN P.A.L.
Cytokinetics of mononuclear phagocyte response to listeriosis in genetically determined sensitive and resistant murine hosts
Clin. Invest. Med., 1984, 7, 165-172
- 66- RACZ P., KAISERLING E., TENNER K., WUTHE H.H.
Experimental *Listeria* cytitis II. Further evidence of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection. An electron microscopic study
Virchows. Arch. B. Zell. Path., 1973, 13, 24-37
- 67- RACZ P., TENNER K., MERO E.
Experimental *Listeria* enteritis I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection
Lab. Invest., 1972, 26, 694-700

- 68- RACZ P., TENNER K, SZIVESSY K.
Electron microscopic studies in experimental keratoconjunctivitis listeriosa I. Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells
Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1970, 17, 221-236
- 69- RAPPAPORT F., ROBINOVITZ M., TOAFF R., KROCHIK N.
Genital listeriosis as a cause of repeated abortion, 1960, Lancet 1, 1273
- 70- ROCOURT J.
Bacteriophages et bacteriocines du genre *Listeria*
Zentralbl. Bakteriolog. Mikrobiol. Hyg. Ser. A., 1986, 261, 12-28
- 71- ROCOURT J.
Listeriose humaine : aspects cliniques et épidémiologiques ; rôle de l'alimentation
Le Biologiste, Janvier-Février 1989, 29-40
- 72- ROCOURT J.
Listeria et Listeriose humaine ; la décennie 1979-1989
Ann. Inst. Pasteur/Actualités p. 25-30
- 73- ROCOURT J.
Taxonomy of the genus *Listeria*
Infection, 1988, 16, suppl. 2, 89-91
- 74- ROCOURT J., GRIMONT P.A.D.
Description of *Listeria welshimeri* sp. nov and *Listeria seeligeri* sp. nov.
Int. J. System. Bact. 33, 1983, 866-869
- 75- ROCOURT J., GRIMONT F., GRIMONT P.A.D., SEELIGER H.P.R.
DNA relatedness among serovars of *Listeria monocytogenes* sensu lato
Curr. Microbiol., 1982, 7, 383-388
- 76- ROCOURT J., HOF H., SCHRETTENBRUNNER A., MALINVERNI R., BILLE J.
Méningite purulente aiguë à *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompétent
Schweiz. Med. Wochenschr., 1986, 116, 248-251

- 77- ROCOURT J., HOF H., SCHRETTENBRUNNER A., SEELIGER H.P.R.
Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes*
sensu lato
Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1983, 134A, 65-71
- 78- ROCOURT J., SEELIGER H.P.R.
Distribution des espèces du genre *Listeria*
Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1985, 259, 317-330
- 79- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN
G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A.
Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
Science, 1988, 239, 487-491
- 80- SARRUT S.
La listeriose maternofoetale. 1) Les lésions placentaires à propos de 75 observations
Rev. Fr. Gynécol. Obst., 1975, 70, 711-720
- 81- SCHLECH III W.F., LAVIGNE P.M., BORTOLUSSI R.A., ALLEN A.C.,
HALDANE E.V., WORT A.J., HIGHTOWER A.W., JOHSON S.E., KING S.H.,
NICHOLLS E.S., BROOME C.V.
Epidemic listeriosis. Evidence for transmission by food
New Engl. J. Med., 1983, 308, 203-206
- 82- SEELIGER H.P.R.
Apathogène listerien : *Listeria innocua* sp. n. (SEELIGER et SCHOOF, 1977)
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig., 1981, 249A, 487-493
- 83- SEELIGER H.P.R.
Notion actuelle sur l'épidémiologie de la listeriose
Med. Mal. Infect., 1976, 6, 9-14
- 84- SEELIGER H.P.R., HÖHNE K.
Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. Methods in Microbiology
(BERGAN T., NOVIRIS J.R., ed)
Academic press, London, New-York, 1979, 13, 31-49

- 85- SEELIGER H.P.R., JONES D.
Genus *Listeria*
In P.H.A. Sneath A., Mair N.S., Sharpe M.E. AND Holt J.G. (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1986, p. 1235-1245
- 86- SEELIGER H.P.R., LINZENMEYER G.
Etude sérologique des souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France
Ann. Inst. Pasteur, 1955, 88, 127-128
- 87- SEELIGER H.P.R., ROCOURT J., SCHRETTENBRUNNER A., GRIMONT P.A.D., JONES D.
Listeria ivanovii sp. nov.
Int. J. System. Bact., 1984, 34, 336-337
- 88- SEELIGER H.P.R., SCHOOFS M.
Serological analysis of non hemolysing strains of *Listeria monocytogenes* sp.
7th International Symposium on the problems of listeriosis, Varna, Bulgarie, 1977
- 89- SIDDIQUE I.H., COOPER G.W.
Hemodynamic effect of *listeria* hemolysin in dogs
Amer. J. Physiol., 1969, 216, 1399-1403
- 90- SOHIER R., BENALET F., PIECHAUD M.
Sur un germe du genre *Listeria* apparemment non pathogène
Ann. Inst. Pasteur, 1948, 74, 54-57
- 91- STEFFAN R.J., ATLAS R.M.
DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples
Appl. Envir. Microbiol., 1988, 2185-2191
- 92- STRAUSS R., HEYMER B., HOF H.
Effects of cyclosporin A on experimental infection with *Listeria monocytogenes*
Clin. Exp. Immunol., 1985, 62, 491-498

- 93- TERPLAN G., SCHOEN R., SPRINGMEYER W., DEGLE I., BECKER H.
Vorkommen, Verhalten und Bedeutung von Listerien in milch und milchprodukten
Anch. Lebensmit., 1986, 37, 129-156
- 94- VOLGIN I.P.
Survival *listeria* outside the host
Vete (Moscow), 1966, 43, 17-19
- 95- WEAGENT S.D., SADO P.N., COLBURN K.G., TORKELESON J.D., STANLEY
F.A., KRANE M.H., SHIELDS S.C., THAYER C.F.
The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products
J. Food Protect., 1988, 51, 655-657
- 96- WELSHIMER H.J., MEREDITH A.L.
Listeria murrayi sp. n. : A nitrate reducing mannitol-fermenting *Listeria*
Int. J. System. Bact., 1971, 21, 3-7
- 97- WERNERS K., NOTERMANS S.
Gene probes for the detection of food-borne pathogens
In gene probes for bacteria. Ed. Macario A.J.L., de MACARIO E.C.
Academic press London, 1990, 353-388
- 98- WIRSING VON KÖNIG C.H., FINGER H., HOF H., EMMERLING P.
Postnatal development of resistance against infection in an experimental model
Zentralbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Crig., 1978, 242A, 547-554
- 99- WIRSING VON KÖNIG C.H., HEYMER B., HOF H., FINGER H.
Course of infection and development of immunity in experimental infection of mice with
Listeria serotypes
Infect. Immun., 1983, 40, 1170-1177
- 100- WOLF J.L., RUBIN D.H., FINBERG R., et al.
Intestinal M cells : a pathway for entry of reovirus into the host
Sci., 1981, 212, 471-472
- 101- YANG H.Y., SKINSNES O.K.
Peritoneal macrophage response in neonatal mice
J. Reticuloendoth. Soc., 1973, 14, 181-190

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	12
Première partie : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	14
I- RESERVOIRS	15
I-1- LE MILIEU EXTERIEUR.....	15
I-2- PRODUITS D'ORIGINE ALIMENTAIRE.....	16
I-2-1- Lait et produits laitiers.....	16
I-2-2- Produits carnés.....	17
I-2-3- Les œufs.....	17
I-2-4- Autres aliments.....	17
I-3- LES ETRES VIVANTS.....	18
I-3-1- Les malades.....	18
I-3-2- Les porteurs de germes.....	19
II- POUVOIR PATHOGENE	20
II-1- LISTERIOSE HUMAINE.....	20
II-1-1- Listeriose fœto-maternelle.....	21
II-1-2- Listeriose de l'adulte.....	22
II-2- LISTERIOSE ANIMALE.....	24
II-2-1- Forme méningoencéphalique.....	24
II-2-2- Forme abortive.....	24
II-2-3- Forme septicémique.....	24
III- PROTOCOLES D'ISOLEMENT ET D'IDENTIFICATION	25
III-1- LES METHODES CLASSIQUES D'ISOLEMENT.....	27
III-1-1- Recherche de Listeria après enrichissement au froid.....	27

III-1-2-	Recherche de <i>Listeria</i> selon le protocole FDA.....	28
III-1-3-	Recherche de <i>Listeria</i> par le milieu sélectif Oxford.....	29
III-1-4-	Recherche de <i>Listeria</i> par l'Agar Selectif Palcam <i>Listeria</i>	30
III-2-	IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE	31
III-3-	LA SEROTYPAGE ET LA LYSOTYPAGE.....	34
III-4-	MOBILITE ELECTROPHORETICQUE DES ISO-ENZYMES DE LISTERIA MONOCYTOGENES.....	37
III-5-	LES SONDAS.....	40
III-6-	LES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	41
III-7-	LES POLYMERASE-CHAINE REACTIONS (PCR).....	41
IV-	VIRULENCE.....	43
IV-1-	LES FACTEURS EXPRIMANT LE POUVOIR PATHOGENE.....	43
IV-1-1-	L'hémolysine.....	43
IV-1-2-	Le fer.....	44
IV-1-3-	Catalase et superoxyde dismutase.....	44
IV-1-4-	"Monocytosis producing activity" - "Immunosuppressive activity".....	45
IV-2-	LE MODELE ANIMAL : LA SOURIS.....	46
IV-2-1-	Les différentes voies d'inoculation.....	46
IV-2-2-	Variation des mécanismes de défense.....	47
IV-2-2-1-	L'âge.....	47
IV-2-2-2-	Immunocompétence.....	49
IV-2-2-3-	Génétique.....	4
IV-3-	LE MODELE CELLULAIRE.....	51
IV-3-1-	Cytotoxicité.....	51
IV-3-2-	Entrée et devenir de <i>Listeria</i> dans la cellule.....	51
IV-3-2-1-	Mécanismes d'entrée de <i>Listeria monocytogenes</i> dans le corps humain.....	52

IV-3-2-2-	Modèle d'infection in vitro d'une lignée cellulaire enterocyte-like cultivée.....	54
IV-3-2-3-	Croissance de <i>Listeria monocytogenes</i> à l'intérieur des macrophages.....	55
Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS.....		57
I- INTRODUCTION.....		58
II- MATERIEL ET METHODES.....		59
II-1-	SOUCHES BACTERIENNES ET PREPARATION DE L'INOCULUM.....	59
II-2-	L'HEMOLYSINE.....	60
II-3-	INOCULATION DES SOURIS.....	61
II-4-	DENOMBREMENT DES BACTERIES DANS LES ORGANES.....	62
II-5-	EVALUATION STATISTIQUE.....	62
III- RESULTATS.....		63
III-1-	HEMOLYSINE.....	63
III-2-	MORTALITE DES SOURIS APRES INJECTION INTRAPERITONEALE DE LISTERIA	63
III-3-	DETERMINATION DU NOMBRE DE LISTERIA DANS LE LIQUIDE DE LAVAGE PERITONEAL 72 h. APRES L'INJECTION.....	65
III-4-	VARIATION DU POIDS DE LA RATE EN FONCTION DE LA SOUCHE INOCULEE	67
III-5-	DETERMINATION DU NOMBRE DE LISTERIA PAR GRAMME DE FOIE ET DE RATE EN FONCTION DES SOUCHES INOCULEES.....	67
III-6-	RECHERCHE DE LISTERIA DANS LES CERVEAUX APRES 24 à 48 h. A 37°C ET 7 JOURS D'INCUBATION à 30°C.....	72
IV- DISCUSSION.....		73
CONCLUSION.....		75
BIBLIOGRAPHIE.....		77

CHARLOT (Sylvie, épouse GOVAERT). — Etude de la virulence de sérotypes de *Listeria monocytogenes* et d'autres espèces de *Listeria* dans l'infection expérimentale chez la souris. — 93 f.; ill.; tabl.; 30 cm (Thèse : Pharm.; Limoges ; 1991).

RESUME :

Les *Listeria* sont des bactéries ubiquitaires responsables d'infections d'origine alimentaire qui atteignent préférentiellement la femme enceinte et le nouveau-né ainsi que l'adulte immunodéprimé.

Le but de notre travail a été de tester la virulence de plusieurs souches sauvages du genre *Listeria* isolées d'aliments et de listérioses animales. Nous avons pris comme modèle expérimental la souris Swiss infectée en intrapéritonéale par une dose appropriée de *Listeria*.

L'étude de la colonisation du liquide de lavage péritonéal, du foie, de la rate et du cerveau, 72 heures après l'injection, nous a permis de mettre en évidence l'importance de l'espèce de *Listeria* et du sérotype de *Listeria monocytogenes* dans l'expression de la pathogénicité de ces différentes souches.

MOTS CLES :

- *Listeria*.
- Sérotype.
- Souris.
- Virulence.

JURY : Président
Juges

: Monsieur le Professeur NICOLAS.
: Madame BOSGIRAUD, Maître de Conférences.
Monsieur BOTINEAU, Maître de Conférences.
Madame RICHON, Docteur en Médecine.
