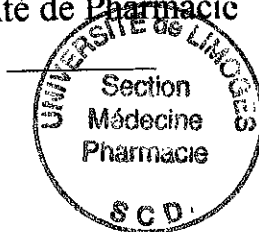


UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Pharmacie



ANNEE 1994

THESE N° 244

**LA VIRULENCE DES LISTERIA :
MISE AU POINT D'UN
PROTOCOLE DE DOSAGE DE LA
LISTERIOLYSINE O IN VITRO**

THESE

pour le

DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 10 Octobre 1994

par

Nathalie FOULHOX

née le 16 Août 1970 à Guéret (Creuse)

EXAMINATEURS de la THESE

Madame le Professeur BOSGIRAUD **PRESIDENT**
Monsieur le Professeur NICOLAS **JUGE**
Madame DELEBASSEE, *Maître de Conférences* **JUGE**
Madame GORGE, *Pharmacien* **JUGE**

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE LIMOGES

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur RABY
ASSESEURS : Monsieur le Professeur GHESTEM
Monsieur DREYFUSS, Maître de Conférences

PERSONNEL ENSEIGNANT

* PROFESSEUR DES UNIVERSITES

BENEYTOU Jean-Louis	BIOCHIMIE
BERNARD Michel	PHYSIQUE BIOPHYSIQUE
BOSGIRAUD Claudine	MICROBIOLOGIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE, CHIMIE THERAPEUTIQUE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
GHESTEM Axel	BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE
GUICHARD Claude	TOXICOLOGIE
HABRIOUX Gérard	BIOCHIMIE
LEFORT DES YLOUSES Daniel	PHARMACIE GALENIQUE
NICOLAS Jean Albert	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE PARASITOLOGIE
ODART Nicole	PHARMACODYNAMIE
PENICAUT Bernard	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
RABY Claude	PHARMACIE CHIMIQUE ET CHIMIE ORGANIQUE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

POMMARET Maryse

A mon père, ma mère, Albert et toute ma famille,

en témoignage de ma profonde affection , pour le soutien qu'ils
ont su m'apporter tout au long de mes études .

A Madame le professeur Claudine BOSGIRAUD

Professeur des Universités de Bactériologie-virologie-Parasitologie .

Pour avoir bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury de
notre thèse .

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 le professeur Jean-Albert NICOLAS

Professeur de Bactériologie et Virologie, Parasitologie .

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

Veillez accepter l'expression de notre profond respect .

A Madame Sylvie DELEBASSEE

Maître de Conférence

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

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

A Madame Odile GORGE

Pharmacien

C'est pour nous une grande fierté que de vous voir participer à notre jury de thèse .

Nous vous exprimons ici toute notre gratitude .

Plan

INTRODUCTION

Première partie : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LES LISTERIOSES

I.1 Listériose animale

I.1.a) Formes abortives

I.1.b) Formes méningo-encéphaliques

I.1.c) Formes septicémiques

I.1.d) Formes asymptomatiques et mammites

I.2 Listériose humaine

I.2.a) Foeto-maternelle

I.2.b) Adulte et grand enfant

I.3 Traitements et prévention

I.3.a) Traitements

I.3.b) Prévention

II. RESERVOIRS

II.1 Milieu extérieur

II.2 Produits alimentaires

II.3 Les êtres vivants

III. BACTERIOLOGIE

- III.1 Morphologie
- III.2 Conditions de développement
- III.3 Caractères biochimiques
- III.4 Typage
- III.5 Isolement
- III.6 Conservation

IV. COMPORTEMENT DE LA BACTERIE

- IV.1 Au sein de l'organisme
- IV.2 Au niveau intra-cellulaire

V. L'HEMOLYSINE

- V.1 Caractéristiques
- V.2 Listériolysine et immunité
 - V.2.a) Généralités
 - V.2.b) Chez le sidéen
- V.3 Recherche de l'hémolysine
 - V.3.a) CAMP-test traditionnel
 - V.3.b) Nouveau mécanisme du CAMP-test
- V.4 Détermination du pouvoir hémolytique de la LLO

VI. LES AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE

- VI.1 PI-PLC

VI.2 PLC

VI.3 Métalloprotéase

VI.4 Protéine P60

VI.5 Internaline

VI.6 Préphénate déhydratase

Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS

I. MATERIEL ET METHODES

I.1 Matériel

I.1.a) Origine des souches sauvages

I.1.b) Les souris

I.1.c) Produits chimiques et milieux de culture

I.2 Méthodes

I.2.a) Préparation des inoculums

I.2.b) Dénombrement des inoculums

I.2.c) Injection des inoculums aux souris

I.2.d) Prélèvement des organes

I.2.e) Dénombrement des bactéries sur le foie et la rate

I.2.f) Extraction de l'hémolysine

I.2.g) Mesure de l'activité hémolytique

I.2.h) Etude des différents paramètres

II. RESULTATS

II.1 Identification des souches étudiées

II.1.a) Caractères d'identification classique

II.2.b) Caractères de différenciation

II.2 Dénombrement des germes dans les organes

II.3 Dosage de l'activité hémolytique

II.3.a) Recherche de la concentration optimale en globules rouges

II.3.b) Etude de la filtration du surnageant

II.3.c) Rôle de la solution tampon

II.3.d) Coloration finale des dilutions

II.3.e) Dosage de l'activité hémolytique en microméthode

III. DISCUSSION

CONCLUSION

INTRODUCTION

Les *Listeria* sont des bacilles Gram positif, saprophytes largement répandus dans la nature et à caractère ubiquitaire . Parmi les différentes espèces de *Listeria*, *Listeria monocytogenes* peut occasionnellement induire des infections sévères chez l'homme et la plupart des espèces animales comme les mammifères et les oiseaux .

Les infections humaines, appelées listérioses constituent actuellement un problème préoccupant en santé publique touchant presque exclusivement les pays tempérés comme le continent Nord-américain et l'Europe . La dernière épidémie de listérioses en France, en 1992, a fait l'objet de recommandations de la part du ministère de la santé et de l'action humaine (11 septembre 1992) .

En pathologie humaine, les principales cibles sont : la femme enceinte, le sujet immunodéprimé et les personnes âgées .

La virulence et le pouvoir infectieux de *L.monocytogenes* sont en relation avec le sérotype . Au sein d'un même sérotype, il a été mis en évidence des différences de virulence en fonction de la souche sauvage .

C'est pourquoi nous avons consacré notre travail à rechercher le rôle de l'hémolysine comme facteur de virulence . En utilisant les souches bactériennes mises à notre disposition nous avons dosé l'hémolysine de plusieurs sérotypes de *Listeria* en prenant comme modèle expérimental la souris Swiss infectée par voie intrapéritonéale .

Le dosage *in vitro* de l'activité hémolytique de la listériolysine O a été évalué en fonction des variations de DO obtenu après lyse de globules rouges de mouton .

**REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE**

I. LES LISTERIOSES.

La listériose est une maladie infectieuse, commune à l'homme et l'animal, qui se manifeste sous forme de pathologies sévères, parfois mortelles . Le genre *Listeria* comporte plusieurs espèces : *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri* et *L. welshimeri*. Parmi toutes ces espèces, *L. monocytogenes* est la seule responsable d'infections chez l'homme et l'animal . *L. ivanovii* a été isolée de quelques cas d'avortement chez des ovins mais pas chez l'homme .

Les autres espèces : *L. welshimeri* et *L. innocua* ne sont pas pathogènes (106-176) .

Chez *L. monocytogenes* de nombreux sérotypes ont été mis en évidence : 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e .

La prédominance du sérotype 4b dans les cas pathologiques est reconnu (120-171), alors que les sérotypes 1/2 a et 1/2 c sont plus fréquemment isolés dans les aliments (29) .

I.1) LISTERIOSE ANIMALE

La listériose est une infection fréquemment retrouvée chez les animaux. En effet, la bactérie peut être hébergée naturellement dans le tube digestif (8), sans provoquer de manifestation clinique . Les animaux porteurs sains disséminent la bactérie dans le milieu extérieur par l'intermédiaire de leurs fécès . La contamination et le développement de la maladie seront souvent en relation avec un système immunitaire déficient .

On rencontre différents types de pathologies :

I.1.a) Les formes abortives :

La listériose se manifeste par des avortements (39) ou la naissance de mort-nés . L'animal nouveau-né peut aussi naître infecté et présenter une pathologie plus tardive comme une méningite ou une forme septicémique .

I.1.b) Les formes méningo-encéphaliques :

C'est la forme la plus fréquente chez les ruminants . L'animal présente des troubles du comportement comme la lenteur au déplacement, l'isolement, des troubles locomoteurs, des troubles visuels qui évoluent vers une paralysie partielle ou générale, puis le coma et enfin la mort .

I.1.c) Les formes septicémiques :

C'est la forme la plus commune chez les petits animaux et les sujets jeunes . La bactérie envahit l'organisme plus ou moins vite, ce qui se traduit par la mort rapide ou un amaigrissement avec anorexie.

I.1.d) Les formes asymptomatiques et mammites :

Il existe des formes asymptomatiques et des mammites infracliniques au cours desquelles *L.monocytogenes* est excrétée dans le lait .

I.2) LISTERIOSE HUMAINE

L.monocytogenes est un germe habituellement peu pathogène chez l'hôte humain immunocompétent . L'expression de sa virulence se manifeste lorsque les défenses naturelles de l'organisme sont déficientes (notion de terrain et caractère "opportuniste" de *Listeria monocytogenes*) .

Les sujets à risques sont les femmes enceintes, les personnes âgées, les enfants de moins de 15 ans et les adultes immunodéprimés (maladie hépatique, alcoolisme, cancers, traitements immunodépresseurs, hémopathies) .

I.2.a) Atteinte foeto-maternelle :

La fréquence de la listériose en France est de l'ordre de 1/250 grossesses . Ceci représente environ 30 % de l'ensemble des listérioses (23) . La listériose peut se rencontrer chez la femme enceinte et chez le nouveau-né (160) .

a) Listériose chez la femme enceinte :

L'infection peut survenir à n'importe quelle période de la grossesse mais les conséquences seront graves surtout si la bactérie atteint la mère dans les deux derniers trimestres de la grossesse .

Pour la mère la symptomatologie sera le plus souvent bénigne :

- léger syndrome pseudo-grippal,
- fièvre,
- asthénie .

La listériose est grave pour le fœtus et le nouveau-né . **C'est pourquoi, tout épisode fébrile chez une femme enceinte doit entraîner des examens cyto bactériologiques des urines et des hémocultures qu'il faut renouveler (107-160) .** Lorsque la listériose survient au cours des deux premiers trimestres, elle peut entraîner un avortement, dont il est difficile d'apprécier la fréquence. L'épisode infectieux est souvent proche ou contemporain de l'expulsion (23) lors de l'accouchement .

Lorsqu'elle survient au cours du troisième trimestre, elle peut avoir comme conséquence la mort du fœtus *in utero*, et surtout un accouchement prématuré et une infection néo-natale (23) .

b) Listériose chez le nouveau-né :

A la différence de celle de la mère, elle est grave et redoutée des cliniciens .
Classiquement deux tableaux cliniques peuvent se traduire par :

- **Une forme précoce** : elle est diagnostiquée dès l'accouchement, souvent chez un enfant prématuré souffrant d'une septicémie généralisée gravissime ("granulomatosis infantiseptica") . L'enfant naît en état de souffrance . Il présente des problèmes respiratoires, neurologiques et biliaires .

Parfois des formes atténuées ou inapparentes se traduisent par une conjonctivite suppurée qui peut être la seule manifestation clinique ; son évolution est en général simple, mais elle comporte le risque d'une transmission manuportée à d'autres nouveaux-nés .

- **Une forme tardive** : elle apparaît au-delà du septième jour après la naissance; le plus fréquemment sous la forme d'une méningite chez un enfant né à terme . Cette forme méningée sera semblable à celle de l'adulte . La mortalité est de 25 % . Les séquelles sont toujours redoutées : hydrocéphalie, retard psychomoteur (107).

En présence d'un enfant apparemment sain, des recherches systématiques de *L.monocytogenes* à partir d'échantillons de méconium, de liquide gastrique ou encore de placenta ont montré qu'un faible pourcentage de ces prélèvements sont positifs (48) . Si les résultats sont positifs, il est bien entendu indispensable de traiter cet enfant afin d'éviter l'évolution éventuelle vers la méningite ou la septicémie . En revanche, *L.monocytogenes* n'étant pas un hôte habituel de la cavité vaginale, seule la culture des prélèvements effectués quelques jours avant et après l'accouchement permettra de déceler ou de confirmer la présence de cette bactérie .

Le diagnostic doit être fait avant tout traitement (107-163) .

Le passage de la bactérie de la mère au fœtus peut se faire par 4 mécanismes différents :

- la voie hématogène transplacentaire (169),
- la voie ascendante transmembranaire,

- la voie endométriale,
- la contamination pendant l'accouchement lors de la traversée des voies génitales contaminées .

Listeria monocytogenes arrive au troisième rang après *Escherichia Coli* et le Streptococoque du groupe B, pour les infections néo-natales .

1.2.b) Forme clinique chez l'adulte et le grand enfant :

Il est possible que chez les sujets sains, un certain nombre de bactériémies à *Listeria*, peu sévères, passent inaperçues ; seules les formes compliquées de méningite étant diagnostiquées .

Chez l'adulte septicémies et infections du système nerveux central sont les formes cliniques les plus fréquentes . Aucun signe clinique particulier ne permet de distinguer une méningite listérienne d'une autre méningite bactérienne; aussi le diagnostic étiologique ne dépend-il que de l'isolement du germe à partir du liquide céphalo-rachidien (LCR), de l'analyse cyto bactériologique et très souvent de l'hémoculture .

Les encéphalites sont rares ; elles se traduisent cliniquement par les signes d'une rhombencéphalite avec une atteinte du système nerveux central sans méningite associée . Elle débute par des céphalées dans un contexte fébrile, suivies 8 à 10 jours plus tard de l'apparition de signes d'atteinte des nerfs crâniens, sans syndrome méningé associé . Le diagnostic ne repose au début que sur l'isolement du germe à partir du LCR lors de la contamination secondaire des méningites . Leur pronostic demeure grave en dépit d'un traitement adéquat . Parmi les formes cliniques rares, les endocardites sont les plus fréquentes (65) .

Les endocardites à *L.monocytogenes* surviennent principalement chez des malades présentant une lésion cardiaque, en particulier les porteurs de prothèses valvulaires (164) .

Les atteintes locales à *L.monocytogenes* sont rares .

Le rôle du terrain est certain puisqu'un âge avancé, **une maladie sous-jacente ou un traitement immuno-suppresseur sont retrouvés dans 30 à 70 % des cas** selon les études, et la localisation de l'infection . L'infection à VIH, même au stade de SIDA, ne paraît

pas être un facteur de risque de listériose, probablement parce qu'il existe, dans les mécanismes de résistance à *Listeria*, des facteurs autres que les lymphocytes T (23) . Une étude récente a mis en évidence une fréquence de 19 % d'apparition de listériose chez des patients atteints par le VIH (90) . Ainsi, même si le pourcentage de listériose, chez les patients infectés par le VIH, est supérieur à celui de la population générale (même âge et même sexe) avec un taux de risque plusieurs fois plus élevé (76-123-162), l'infection à *L.monocytogenes* est loin de représenter la majorité des causes de méningites chez les patients VIH, comme elle peut en être responsable chez les cancéreux (145) .

La listériose humaine est caractérisée par le polymorphisme de ces manifestations:

- **atteinte neuro-méningée** : elle peut avoir différents aspects,
 - * méningites aiguës suppurées : liquide xanthochromatique du LCR,
 - * méningites aiguës d'allure virale : liquide clair, limpide,
 - * méningites subaiguës : altération de l'état général et du LCR de

façon progressive .

Mais quelle que soit sa catégorie, la méningite peut s'associer à des signes de souffrance cérébrale (convulsions, troubles de la conscience, paralysie des nerfs crâniens) (74) .

L'infection du SNC concerne 30 à 50 % des listérioses de l'adulte . La bactériémie est associée dans plus de la moitié des cas .

L'évolution des méningites à *Listeria*, en début de traitement, peut être une majoration des troubles encéphaliques, mais secondairement les signes d'atteinte du tronc cérébral ou du cervelet peuvent régresser, avec ou sans séquelle, la régression se faisant parfois à distance de l'épisode aigu (23) .

- **septicémies listériennes** : les septicémies primitives, sans atteinte neuro-méningée, représentent environ 40 % des listérioses de l'adulte . La mortalité est élevée, environ 40 %, d'autant plus que l'âge est avancé . Elles sont le plus souvent isolées ou associées à certaines localisations : pneumonie, endocardite, ostéomyélite, arthrite, cholécystite, péritonite, hépatite ou abcès hépatique . La principale manifestation est la fièvre, à

laquelle peut s'associer des signes non spécifiques : asthénie, malaise, troubles digestifs à type de nausées, crampes, vomissements, diarrhées .

La plupart des patients ont une maladie sous-jacente ou un traitement immunosuppresseur .

L'endocardite survient principalement sur une lésion cardiaque pré-existante, valve native, prothèse mécanique ou bioprothèse (23) .

- **listérioses localisées** : très rares, elle se manifestent parfois sous la forme d'atteintes :

~ amygdaliennes ressemblant à la mononucléose infectieuse .

~ endophtalmiques à type de conjonctivite suppurée ou de kératite (8) .

~ cervico-ganglionnaires dont l'évolution peut se faire vers la suppuration ou la fistulisation (23) .

~ abcès du foie, cholécystites, péritonites, infection pleuro-pulmonaire et cutanée (164) .

I.3) TRAITEMENTS ET PREVENTION

I.3.n) Traitements

Le traitement de la listériose doit tenir compte de deux données :

- *L. monocytogenes* est un germe à multiplication intracellulaire;
- l'infection touche des sites difficilement accessibles par les antibiotiques (LCR, parenchyme cérébral, placenta) .

La virulence et la multiplication intracellulaire de *L.monocytogenes*, la sévérité des manifestations cliniques, le terrain fréquemment immunodéprimé sur lequel survient ce type d'infection, nécessite le recours à une antibiothérapie bactéricide pénétrant dans les divers sites infectieux .

En l'absence d'études comparatives, des différents schémas antibiotiques possibles, le choix thérapeutique reste basé sur les données bactériologiques, pharmacocinétiques et sur les résultats des études expérimentales.

a) Données bactériologiques :

L.monocytogenes est une bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques (173).

In vivo, la sensibilité est constante aux pénicillines G et A, aux aminosides, aux macrolides, aux cyclines, au chloramphénicol, à la vancomycine, à la rifampicine et au cotrimoxazole (36-67-85-152-173) . L'activité de ces antibiotiques reste stable, toutefois, l'existence de plasmides de résistance a été démontrée pour le chloramphénicol, l'érytromycine et les tétracyclines, mais pas pour les bêta-lactamines (152) .

De façon exceptionnelle, quelques souches résistantes à l'ampiciline ont été décrites . **Les céphalosporines, notamment celles de troisième génération, ont des concentrations maximales inhibitrices (CMI) élevées, contre-indiquant leur utilisation dans le traitement de la listériose (85-173) .**

L'acide nalidixique et les nouvelles fluoroquinolones sont également peu actives, les CMI étant de l'ordre de 1 à 8 mg/l. L'activité *in vitro* de l'imipénème est variable selon les auteurs .

Parmi les antibiotiques actifs, aucun, pris isolément n'a d'activité bactéricide *in vitro* . Une bactéricidie est obtenue avec les associations amoxicilline-gentamicine, triméthoprim-sulfaméthoxazole, imipénème-gentamicine, avec un effet synergique (67) . Par contre, les molécules comme le chloramphénicol, la rifampicine, l'érythromycine et les tétracyclines démontrent un antagonisme, *in vitro* , avec les bêta-lactamines (36-85-173) . (Tableau 1) .

TABLEAU 1 :

**ACTIVITE INHIBITRICE DE 13 ANTIBIOTIQUES VIS-A-VIS DE 74 SOUCHES
CLINIQUES DE L.MONOCYTOGENES ISOLEES EN SUISSE . (173)**

Antibiotique	Concentration minimale inhibitrice (µg/ml)		
	Valeurs limites	CMI 50 %*	CMI 90 %*
Pénicilline	0,06-0,5	0,25	0,5
Amoxicilline	0,12-0,5	0,25	0,25
Pipéracilline	0,5-4	4	4
Ceftriaxone	8-128	64	128
Imipénème	0,03-0,25	0,12	0,12
Gentamicine	0,25-1	0,5	0,5
Chloramphénicol	4-8	8	8
Érythromycine	0,12-0,25	0,25	0,25
Triméthoprime + Sulfaméthoxazole	0,03/0,57-0,12/2,28	0,03/0,57	0,06/1,14
Ciprofloxacine	0,5-2	1	1
Rifampicine	0,03-0,25	0,12	0,12
Vancomycine	1-2	2	2
Teicoplanine	0,25-0,5	0,5	0,5

b) Données pharmacocinétiques :

Pour être actifs *in vivo*, les antibiotiques doivent diffuser à des concentrations suffisantes au niveau du site infectieux . En matière de listériose, on se trouve confronté à plusieurs exigences : d'une part, il s'agit d'un germe à multiplication intracellulaire (macrophages), d'autre part l'infection à *Listeria* touche des sites difficilement atteignables par les antibiotiques (liquide céphalo-rachidien et parenchyme cérébral dans les formes neuro-méningées, placenta dans les listérioses maternelles) (36-85-173).

Parmi les antibiotiques actifs, le cotrimazole, la rifampicine, les cyclines, les macrolides et le chloramphénicol ont une bonne pénétration intracellulaire . Bien que l'amoxicilline soit considérée comme ayant une mauvaise pénétration cellulaire, elle est active *in vitro* sur les *Listeria* intracellulaire, avec une activité qui reste supérieure à celle des autres antibiotiques . Le passage dans le LCR des antibiotiques est augmenté par l'inflammation méningée observée à la phase aiguë des méningites . Des concentrations efficaces peuvent être ainsi obtenues dans le liquide céphalo-rachidien avec la pénicilline, l'amoxicilline, l'imipénème, le triméthoprim et la rifampicine . La diffusion méningée des aminosides est mauvaise, facilitée par l'inflammation méningée quasi nulle en cas de récupération de méningites saines (36-85-173) .

Au niveau du parenchyme cérébral, la liposolubilité de l'antibiotique est un facteur important de sa diffusion . Le chloramphénicol a une très bonne diffusion cérébrale (supérieure à la diffusion méningée) alors que la situation inverse est constatée pour la pénicilline et l'amoxicilline (85-173) .

La diffusion placentaire et foetale de l'amoxicilline est satisfaisante .

c) Schémas thérapeutiques : (37-85-173)

Bien qu'aucune étude contrôlée n'ait comparé les différents schémas thérapeutiques potentiellement actifs sur la listériose, l'usage est d'utiliser pour le traitement des formes sévères (neuro-méningée, materno-foetale) et/ou survenant chez l'immunodéprimé l'association ampicilline-aminoside .

~ Listériose neuro-méningée :

Le schéma thérapeutique de référence reste l'association amoxicilline (200 mg/kg/j en six perfusions courtes) et aminoside (6 mg/kg/j) par voie intraveineuse . Le choix de l'aminoside se portera le plus souvent sur la gentamicine, qui a montré une synergie d'action avec l'ampicilline *in vitro* et dans les modèles animaux . La durée du traitement n'est pas clairement codifiée . La plupart des auteurs recommandent une durée de 2 à 6 semaines . En cas d'allergie aux β -lactamines ou de forme encéphalitique dominante l'association chloramphénicol-aminoside, ou triméthoprime-sulfémétozasol, peut être proposée . Le cotrimoxazole, par voie intraveineuse, est une alternative intéressante en l'absence de contre indication et d'effets secondaires de cette molécule . L'association amoxicilline-cotrimoxazole a également été utilisée.

~ Septicémie à *Listeria* : (36-85-173)

Bien que l'association amoxicilline-aminoside confère une synergie de bactéricidie *in vitro*, le bénéfice de l'association n'est pas cliniquement prouvé . Pour certains une monothérapie par amoxicilline serait suffisante dans de nombreux cas, l'addition d'un aminoside n'étant indiquée qu'en cas de facteurs de mauvais pronostic (âge supérieur à 50 ans, maladie sous-jacente, greffe rénale, défaillance cardiaque) .

~ Listériose néonatale : (36-85-173)

Devant une infection néonatale précoce (première 48 heures), l'antibiothérapie doit être débutée en urgence, une fois les divers prélèvements réalisés, et faire appel, en première intention, à une amoxicilline ou une uréido-pénicilline par voie intraveineuse .

Les céphalosporines de troisième génération ne sont pas conseillées en monothérapie dans cette situation de traitement empirique en raison de leur faible activité sur *Listeria* .

Une triple association (amoxicilline, céphalosporine de troisième génération et aminoside) peut être également proposée, afin d'être actif, en traitement empirique initial sur les trois principaux germes d'infection néonatale sévère précoce : *Listeria*, *E.Coli* et Streptocoque du groupe B .

Le traitement de référence de la listériose systémique précoce et de la méningite néonatale, est l'association amoxicilline (200 mg/kg/j) et gentamicine (3 mg/kg/j), la durée du traitement étant de 10 jours en cas de septicémie, d'au moins 3 semaines en cas de méningite .

~ Listériose de la femme enceinte (méningite exclue) : (36-85-173)

Toute fièvre isolée inexplicée, persistant plus de 5 jours, ou un état pseudo-grippal (fièvre, frissons, courbatures) survenant chez une femme enceinte impose la pratique d'hémocultures et la prescription systématique d'amoxicilline par voie orale pendant 10 jours (125) .

En cas de positivité des hémocultures à *Listeria*, la voie intraveineuse est préconisée, en associant amoxicilline (6 à 12 g/j) et gentamicine (4 mg/kg/j) pendant 15 jours.

Si la listériose survient au cours du troisième trimestre de la grossesse, certains recommandent une poursuite de l'amoxicilline (4 g/j) *per os* jusqu'au terme.

En cas d'allergie à la pénicilline, on utilise un macrolide.

~ Listériose chez l'immunodéprimé :

De nombreux cas de listériose ont été décrits chez les patients immunodéprimés, notamment chez les patients ayant reçu une greffe rénale . Aucun schéma thérapeutique n'a fait la preuve de sa supériorité chez l'immunodéprimé . Cependant il semble raisonnable de proposer à ces patients le plus bactéricide, qui associe amoxicilline et aminoside aux doses suscitées chez l'adulte (90) .

Le cotrimoxazole intraveineux semble représenter une alternative intéressante chez ces patients immunodéprimés .

Le risque, bien que faible, de méningite à *Listeria* chez le patient VIH, peut être combattu par l'utilisation de l'association timéthoprimé-sulfaméthoxazol (90) .

I.3.b) Prévention

La prophylaxie vétérinaire est illusoire pour prévenir les risques de contamination à l'homme . En dépit de quelques essais vaccinaux pratiqués chez l'animal, aucune vaccination n'est actuellement au point pour l'homme . En conséquence la prévention consiste essentiellement à diminuer les risques de contamination par les aliments, accompagnés de quelques précautions simples :

- Pour les patients à risque (femmes enceintes, immunodéprimés, personnes âgées) : les Centers for Diseases Control (CDC) aux Etats-Unis ont récemment établi des recommandations :

- . ne pas consommer d'aliments ayant séjourné au réfrigérateur plus longtemps que la date limite de consommation ;
- . cuire soigneusement les aliments d'origine animale ;
- . porter à ébullition les restes alimentaires ou les aliments prêts à être consommés ;
- . laver soigneusement les légumes destinés à être consommés crus ;
- . enlever la croûte des fromages et éviter les fromages à pâte molle ;
- . éviter la consommation de lait cru ou d'aliments au lait cru .

- **Pour les femmes enceintes** : consulter un médecin dès l'apparition du moindre symptôme infectieux .

- **En milieu obstétrical** : il convient d'être particulièrement vigilant quant à la désinfection de la salle d'accouchement, du matériel obstétrical, et aux soins aux nouveau-nés dans les nurseries en raison du risque d'infection nosocomiale .

II . RESERVOIRS

La *Listeria* est une bactérie qui se rencontre dans tous les types de milieux : extérieur, aliments, organisme humain ou animal .

II.1) MILIEU EXTERIEUR

Les *Listeria* sont des bactéries très résistantes aux conditions du milieu extérieur, aussi toutes les espèces de *Listeria* qu'elles soient pathogènes ou non, sont largement présentes dans l'environnement, qu'il s'agisse du sol, des eaux de surface et des eaux d'égouts (169) .

Les *Listeria* sont également responsables de ce qu'on appelle : " la maladie des fourrages " (74). En effet, la bactérie peut être retrouvée dans les ensilages (herbe, maïs) et les fourrages verts (41) . Les *Listeria* se multiplient surtout dans un ensilage où le pH est propice à son développement surtout en périphérie . Une étude récente de l'Institut de l'Elevage montre que le pH des ensilages est le meilleur indicateur de contamination :

- lorsque le pH est strictement inférieur à 4 la présence de *Listeria* reste possible mais avec des niveaux de contamination toujours très faibles (moins d'une *Listeria* par gramme).

- lorsque le pH est supérieur à 4 la présence du germe est plus fréquente (80 % des échantillons) avec des niveaux de contamination souvent très élevés (jusqu'à plusieurs millions par gramme) (128) .

De plus, l'ensilage favorise l'immunodépression chez l'animal et donc sa contamination par les *Listeria* (55-56-143) .

II.2) PRODUITS ALIMENTAIRES

a) Le lait et les produits laitiers :

Il a été mis en évidence au cours de nombreuses expériences [USA (116), Canada (53), Hollande (12), Espagne (46)] que 1 à 45 % des laits étaient contaminés par *Listeria monocytogenes*. Cependant cette contamination peut avoir différentes origines :

- excrétion du germe par la vache laitière ;
- contamination par l'environnement (127).

C'est pourquoi le Ministère de l'Agriculture a fait procéder à une surveillance du lait cru utilisé comme matière première.

Plusieurs études ont été menées concernant les fromages. De ces études, il ressort que 0,5 à 10 % des fromages sont porteurs de *L. monocytogenes* (12-25-52-184).

Les fromages à pâte molle sont le plus fréquemment contaminés.

Cette contamination peut être limitée à la croûte ou diffusée dans la pâte, avec une prévalence pour la croûte (184). Cet aliment est à déconseiller chez la femme enceinte et chez un immunodéprimé. Dernièrement, de nombreuses consignes ont été données afin de maîtriser les risques en fabrication fromagère (112).

b) Autres aliments :

Il a été démontré une forte proportion (40 %) de contamination de la viande crue de boeuf, de porc, de la charcuterie et de la volaille (40-106-109-144).

C'est ainsi qu'en 1992 une épidémie de listériose a frappé la France pendant près de neuf mois. Après de nombreuses recherches l'aliment responsable a été de la langue de porc en gelée. Cette préparation contenait un taux élevé de contamination (500000 *L.monocytogenes* / g) (187).

Plus récemment, une épidémie de listériose, en mai 1993, a touché 25 personnes en France, dont 21 femmes enceintes (4 avortements spontanés et 2 enfants mort-nés). Une enquête épidémiologique, confiée au réseau national de santé publique, a permis de suspecter une origine alimentaire en relation avec la consommation de rillettes de porc de marque "tradilège" (78).

D'autres enquêtes ont démontré une contamination de 26 % dans les produits de la mer, et de 5 % dans les salades ou légumes préemballés (169) .

II.3) LES ÊTRES VIVANTS

Parmi les êtres vivants, tous les porteurs de *Listeria* ne font pas forcément la maladie . C'est pourquoi on peut dire que le porteur sain ou asymptomatique, aussi bien que le malade (si ce n'est plus) est un véhicule dangereux de la bactérie .

Chez les malades la bactérie peut se rencontrer à différents niveaux de l'organisme:

- liquide foeto-maternel ;
- cerveau ;
- LCR ;
- urines ;
- fécès ;
- sécrétions conjonctivales ;
- sécrétions rhinopharyngées ;
- lésions cutanées .

Après une guérison clinique il ne faut pas négliger la possibilité que l'individu peut encore posséder la bactérie et la disséminer . Ainsi, il a été démontré qu'une femme qui a fait un avortement d'origine listérienne et sous traitement, peut encore éliminer le bacille pendant 20 semaines (161) .

Chez de nombreux animaux et individus sains, il a pu être mis en évidence la présence de *Listeria* au niveau des fécès, démontrant l'existence du portage et que les êtres vivants peuvent la disséminer à partir du tube digestif .

Malgré la très grande diversité des réservoirs, il faut rappeler ici que les souches de *Listeria monocytogenes* isolée en pathologie humaine appartiennent le plus souvent au sérotype 4b . Ce sérotype n'a que rarement été retrouvé dans les viandes, fromages ou

poissons. Dans les produits carnés les sérotypes 1/2c et 1/2a dominent ce qui montre une discordance très importante pour l'épidémiologie (134).

III. BACTERIOLOGIE

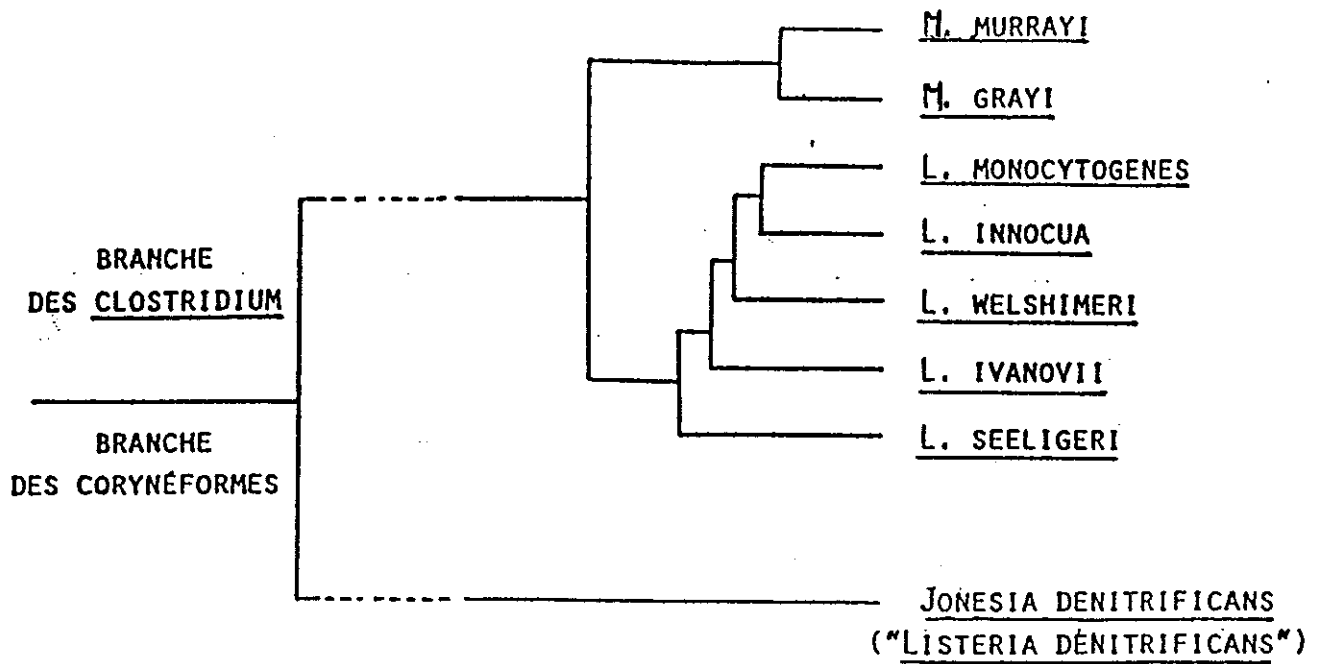
III.1) MORPHOLOGIE

Les *Listeria* sont de petits bacilles Gram positifs de 0,5 µm de large sur 2 µm de long, aux extrémités arrondies, non capsulés et ne formant pas de spores (66). Généralement mobiles à une température comprise entre 20 et 25°C, grâce à des flagelles d'implantation péritriche.

Listeria a été longtemps considérée comme une bactérie corynéforme (principalement en raison de ces caractéristiques morphologiques à la coloration de Gram petit bacille à Gram positif), mais il est désormais pleinement admis que le genre *Listeria* appartient à la branche phylogénétique dite des *Clostridium* avec *Staphylococcus*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* par exemple (23).

Après la description de *L.monocytogenes* en 1926, d'autres espèces ont progressivement été ajoutées au genre *Listeria* : *L.denitrificans* en 1948, *L.grayi* en 1966, *L.murrayi* en 1973, puis récemment, *L.innocua*, *L.welshimeri* et *L.seeligeri* en 1983 et *L.ivanovii* en 1985.

Actuellement, sur base de résultats d'hybridation ADN/ADN et de séquençage partiel de l'ARN ribosomique 16S, le genre *Listeria* est constitué de sept espèces, réparties en deux branches phylogénétiques : l'une comprend *L.monocytogenes*, *L.ivanovii* (les deux seules espèces pathogènes du genre) *L.ivanovii* ne causant que de rares avortements et uniquement chez les ovins et bovins. Auquel on associe *L.innocua*, *L.welshimeri* et *L.seeligeri* tandis que l'autre est formée par *Murraya gravi* et *Murraya murrayi*. *L.denitrificans*, qui s'est avérée partager certains caractères avec des bactéries corynéformes dans de nombreuses études, a récemment été transférée dans un nouveau groupe *Jonesia* (163).



III.2) CONDITIONS DE DEVELOPPEMENT

Listeria est un germe facile à cultiver . Il s'agit en effet de bactéries extrêmement résistantes, (bien qu'elles ne soient pas sporulées) aux conditions du milieu extérieur, notamment au froid car psychotrophes; elles sont largement répandues dans l'environnement : de nombreuses études ont décrit l'isolement de *Listeria* à partir d'échantillons de terre et de végétation, d'eaux de lacs (45) ou encore à partir des eaux d'égouts (2) .

Ce germe peut se multiplier à basse température : 4°C , mais de façon optimal de 30 à 37°C . Il survit à la congélation . Son inactivation est possible à 62°C mais il résiste à un chauffage de 55°C pendant 30 minutes . C'est pourquoi la pasteurisation classique, 71°C pendant 15 secondes, est suffisante pour tuer 10¹⁵ *Listeria monocytogenes* par ml de lait (22-66-113) . Néanmoins, la position intra-cellulaire de la bactérie peut la protéger au cours du traitement .

Cette bactérie est aéro-anaérobie facultatif, avec une préférence pour une tension en oxygène réduite (66) .

Un pH inférieur à 4,5 détruit le germe (163) mais la *Listeria* peut tout de même se multiplier jusqu'à un pH de 5,6 . De même, elle résiste à des milieux basiques pH de 9,6 . Cependant sa croissance optimal se fera à un pH proche de la neutralité : 7,2 à 7,6 .

Cette bactérie est également très résistante aux agents physico-chimiques . Cette particularité est utilisée pour isoler le germe à partir de milieux sélectifs . *Listeria* cultive bien sur les milieux usuels, mais l'adjonction de glucose ou de tryptose favorise la croissance . Après 24 heures d'incubation apparaissent de petites colonies (1mm de diamètre), lisses, à bords réguliers, transparentes et prenant un aspect bleuté quand elles sont observées en transillumination oblique (coloration qui permet de les reconnaître sur l'isolement d'un prélèvement polycontaminé) .

III.3) CARACTERES BIOCHIMIQUES

Au point de vue métabolique, *Listeria* est aéro-anaérobie facultatif, produisant une catalase et présentant un test à l'oxydase négatif . Elle produit de l'acide sans gaz à partir de nombreux glucides, dont le glucose ; la très grande similarité phénotypique existant entre les différentes espèces de ce genre n'a pas permis d'établir un système de biotypie . Cette homogénéité de comportement permet toutefois l'utilisation des galeries API *Listeria* pour l'identification . Les réactions de rouge de méthyl et de Voges-Proskauer sont positives . Enfin, elle n'hydrolyse pas l'urée et ne produit ni indole ni H₂S .

<u>Réactions positives</u>	<u>Réactions négatives</u>
- catalase	- oxydase
- glucose	- gaz en glucose
- VP, RM	- uréase
- esculine	- indole
	- gélatinase
	- H ₂ S

Tableau 2 : Caractères biochimiques communs au genre *Listeria*

L'identification d'espèces est réalisée à l'aide des marqueurs biochimiques suivants:

- **L'hémolyse** : hémolyse spontanée ou Camp-test avec *Staphylococcus aureus* ainsi que Camp-test avec *Rhodococcus equi* sur gélose au sang de mouton .

- **La production d'acide** à partir du D-xylose, L-rhamnose, du mannitol et de l'alpha-méthyl-D-mannoside (la production d'acide étant relativement faible pour certaines espèces, il est vivement recommandé d'utiliser le rouge de phénol comme indicateur de pH) .

- **La réduction des nitrates** .

III.4) TYPAGE

- SEROTYPAGE :

Les premiers serovars ont été décrits en 1940 par Paterson, à partir desquels Donkervoet et Seeliger ont élaboré le schéma antigénique utilisé depuis de nombreuses années (176 a) .

On peut classer les *Listeria* grâce aux :

- Acides teichoïques de paroi qui représentent l'antigène somatique . Ils sont au nombre de 15 (I à XV) .

(Tableau 3)

- Flagelles qui possèdent des antigènes H pour lesquels 5 types A, B, C, D, E, ont été individualisés .

La combinaison des deux types antigéniques O et H définissent le serovar complet de la souche . On distingue 17 serovars parmi lesquels certains sont spécifiques d'une espèce donnée comme le serovar 5 spécifique de *L.ivanovii* .

De plus, l'antigène flagellaire E est spécifique du genre *Murraya* (163) .

En dépit de la diversité des serovars, les souches de *L.monocytogenes*, isolées chez l'homme, font partie essentiellement des serovars 4b, 1/2a et 1/2b . En revanche, la grande majorité des souches d'origine alimentaire appartiennent au sérogroupe 1/2 (13) .

- LYSOTYPIE

En 1977, a été mis au point une méthode permettant de classer de façon très précise les *Listeria* . Cette méthode est basée sur la sensibilité des souches de *Listeria* à certains bactériophages . Les spectres lytiques des bactériophages, qui sont spécifiques de l'espèce et/ou du sérogroupe des souches, permettent de subdiviser des souches de même serovar en plusieurs groupes (169) appelé lysotypes .

Remarque : 25 phages ont été sélectionnés en 1985 lors d'une étude multicentrique pour la lysotypie de *L.monocytogenes* .

- ELECTROPHORESE

L'étude de la mobilité électrophorétique des isoenzymes de *L.monocytogenes* a également permis de discriminer des groupes de souches au sein d'un même serovar (50) .

- SEROLOGIE

De nombreuses réactions existent pour la recherche des anticorps sériques : réaction d'agglutination en utilisant des antigènes O et H, avec et sans 2-mercapto-éthanol, fixation du complément, hémagglutination directe et indirecte, réaction d'agglutination sur gélose .

Les résultats font l'objet de nombreuses discussions . La séroagglutination est la plus souvent utilisée . Un taux minimal de 1/320 ou une séroconversion , en prélevant deux échantillons de sérum à 3 semaines d'intervalle, sont considérés comme significatifs . L'apparition des anticorps n'est pas constante dans les listérioses authentiques .

La sérologie est peut utilisée en pratique, la recherche des anticorps directs est plus fiable (50)

- DISCRIMINATION DES SOUCHES PAR LE PROFIL RAPD

L'amplification en chaîne par polymérase (ou PCR) a été utilisé pour obtenir des profils RAPD (Randomy Amplified Polymorphic DNA) à partir de cellules bactériennes entières dans le but de caractériser des souches de *Listeria* . L'utilisation d'une amorce de 10 nucléotides de séquence arbitraire (HLWL 74) a permis d'obtenir 29 profils d'ADN différents pour 60 souches de collection, comprenant des représentants des 7 espèces de *Listeria* et des sérotypes les plus fréquents . Aucun profil commun n'a été observé pour les souches appartenant à des espèces différentes . Par analyse des profils RAPD il a été possible d'obtenir une discrimination entre des souches d'un même sérotype . L'analyse de profil RAPD est présentée comme la base potentielle d'un nouveau système de typage pour les bactéries du genre *Listeria* et l'oligomère HLWL 74 est présenté comme une amorce à utiliser (126) .

III.5) ISOLEMENT

a) Méthodes classiques

- Echantillons cliniques

La recherche de *Listeria* sur des prélèvements pathologiques humains (sang, méconium, placenta et LCR) nécessitent des techniques d'enrichissement ou l'utilisation de milieux sélectifs (164) .

- Aliments

La recherche des *Listeria* dans les aliments nécessite une phase d'enrichissement des échantillons avant l'isolement et la caractérisation des colonies suspectes .

Les *Listeria* étant résistantes à de nombreux inhibiteurs physico-chimiques, de très nombreux milieux d'enrichissement et milieux d'isolement sélectifs ont été mis au point depuis ces dernières années . Ces milieux contiennent des agents sélectifs variées, tels que l'acriflavine, le tellurite de potassium, l'acide nalidixique, le cycloheximide, la colimycine, le moxalactam, les polymyxines (Tableau 4)

Dernièrement, un milieu sélectif a été mis au point pour la détection de *L.monocytogenes* , *L.innocua* et *L.welshimeri* par essai d'impédimétrie . L'apport de 21 mg/l de moxalactam dans un milieu nutritif enrichie en glucose, supprime d'éventuelle réponses de gram - ou d'autre gram +, permettant une détection quantitative des 3 espèces de *Listeria* en 36 heures (82) .

TABLEAU 4:

Composition de milieux sélectifs utilisés pour l'isolement de *Listeria* (82)

Désignation	Additifs
Bouillon EB	acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide
Bouillon LEB	acriflavine, acide nalidixique, esculine
Bouillon Dominguez	acide nalidixique, polymyxine
Bouillon Yousef	acriflavine, acide nalidixique, cycloheximide, citrate trisodique
Gélose MMA	Chlorure de lithium, cycloheximide, glycine anhydre
Gélose LPM	chlorure de lithium, moxalactam, glycine anhydre
Gélose AC	acriflavine, ceftazidine
« Modified Vogel-Johnson agar »	acide nalidixique, moxalactam, tellurite de potassium
Gélose PALCAM	acide nalidixique, polymyxine, acriflavine, chlorure de lithium, moxalactam, esculine, citrate ferrique ammoniacal
Gélose Oxford	chlorure de lithium, citrate ferrique ammoniacal, colistine, cefotétan, cycloheximide, esculine, fosfomycine



Les bouillons d'enrichissement les plus utilisés sont : Enrichment Broth préconisé par la FDA et *Listeria* Enrichment Broth (LEB), décrit par Donnelly et Baigent (47) . L'isolement est effectué sur géloses sélectives contenant les mêmes agents sélectifs que les bouillons d'enrichissement, les plus utilisées étant : la gélose de Mac Bride modifiée (MMA) et la gélose de Lee et Mac Lain (LPM) (172) .

Depuis l'épidémie de listériose de 1938 au Massachussets, la Food and Drug Administration a développé un protocole recommandé officiellement en France pour l'analyse des produits laitiers (134) .

b- METHODES RAPIDES

- Méthodes spécifiques du genre :

~ Technique immunoenzymatique, basée sur la recherche d'une protéine spécifique du genre *Listeria* (29) ;

~ Sonde d'ADN, détectant une séquence spécifique de l'ARN ribosomique 16 S (29) ;

~ Cytofluorométrie de flux (29) .

- Méthodes spécifiques de *L.monocytogenes* :

~ Sondes constituées d'un fragment du gène de l'hémolysine (29) ;

~Sondes constituées du gène codant pour une protéine impliquée dans l'hypersensibilité retardée induite lors de l'infection expérimentale à *L. monocytogenes* (29) .

III.6) CONSERVATION

En tant que germe très résistant *Listeria* ne pose pas de difficultés particulières lors de sa conservation : ses souches peuvent survivre de nombreuses années en gélose profonde ; la lyophilisation ou la congélation sont également possibles (172) .

IV. COMPORTEMENT DE LA BACTERIE

IV. 1) AU SEIN DE L'ORGANISME

A partir de nombreuses observations cliniques, épidémiologiques et anatomopathologiques, on peut décrire un "scénario" plausible de l'infection par *L.monocytogenes*.

Le premier évènement survenant au cours du processus infectieux est la pénétration des bactéries par voie digestive. A la lumière d'épidémies spectaculaires récentes (104), il a été démontré que les bactéries responsables étaient surtout transmises par des aliments contaminés (salade de choux, fromages, produits laitiers, viandes mal cuites).

Ce caractère invasif de *L.monocytogenes* n'est pas exclusivement localisé à l'intestin, puisqu'on a rapporté de façon anecdotique des atteintes conjonctivales pharyngées ou pulmonaires, facilement reproductibles expérimentalement (18).

Deux théories s'affrontent :

1- Selon Racz et al (157) : ils pensent que l'entrée de *L.monocytogenes* se fait dans l'intestin grêle. Cette bactérie serait un parasite intracellulaire capable de pénétrer dans les cellules non phagocytaires et de se développer à l'intérieur des cellules.

Cette théorie est soutenue par le fait que des épithéliums d'autres organes peuvent être pénétrés : chez des animaux expérimentaux il a été mis en évidence que *L.monocytogenes* pouvait entrer dans l'épithélium cornéen, conjonctif, bronchique et urinaire (157-158-159).

2-Selon Mac Donald et Carter un modèle différent existerait pour l'invasion par *L.monocytogenes* . La bactérie pénétrerait par les plaques de Peyer .

La bactérie utiliserait une cellule absorbante : cellule M, pour traverser la barrière épithéliale intestinale . Les bactéries ne subiraient alors, pas de réplication significative à l'intérieur des cellules absorbantes . Elles seraient ensuite phagocytées par les macrophages, associés avec les cellules M (150-194) .

Des études au microscope électronique de l'infection des cellules CaCo2 entérocyte like par *L.monocytogenes* ont confirmé les résultats de Racz et al dans l'entérite (158) .

Après avoir franchi l'épithélium intestinal, les bactéries passent dans la circulation sanguine où elles sont immédiatement phagocytées par les macrophages résidents du système réticulo-endothélial, en particulier par les cellules de Kupffer du foie et par les macrophages de la rate (142) . Depuis les travaux de Mackaness (118), on sait que *L. monocytogenes* peut se multiplier dans les phagocytes et créer les granulomes inflammatoires au contact des endothéliums vasculaires . Ces granulomes inflammatoires sont surtout constitués de polynucléaires et de macrophages . Si les défenses immunitaires ne peuvent contrôler l'infection, les bactéries envahissent secondairement de nombreux organes en franchissant les endothéliums capillaires : placenta, peau, système nerveux central (18) .

IV . 2) INTRA-CELLULAIRE

Le devenir de *L.monocytogenes* au niveau intra-cellulaire, a été étudié sur la lignée cellulaire J 774 macrophage-like par Tilney et Portnoy (10-186) : par l'intermédiaire de

l'internaline (62), la bactérie est phagocytée par la cellule; la membrane du phagosome est dissoute sous l'effet de la listériolysine, et peut-être dans certaines conditions par action de la phospholipase C (139), la bactérie se retrouve libre dans le cytoplasme (44a).

Deux heures après l'infection, chaque *Listeria* libre dans le cytoplasme provoque la polymérisation de filaments d'actine. Dernièrement, un polypeptide de 90 kDa : Act A, a été découvert chez une souche de *L.monocytogenes*. Il serait nécessaire à l'initiation de l'accumulation d'actine, mais n'interviendrait pas directement dans la formation de la "queue" d'actine. Des analyses ont mis en évidence l'absence de polypeptide Act A au niveau du sérotype 3a (97).

Recouverte par ces filaments, elle se divise puis migre du centre de la cellule vers sa périphérie entraînant derrière elle les filaments d'actine réorganisés en "queue de comète" (environ 5 µm de long). La *listeria* migre vers la surface de la cellule hôte avec sa "queue de comète" orientée vers le centre de la cellule (97-186).

La *Listeria* s'incorpore dans une extension cellulaire (= pseudopode) qui entre en contact avec la cellule voisine et qui la phagocyte. Elle se retrouve enveloppée par une double membrane : l'extension cellulaire de la première cellule infectée et la membrane de la nouvelle cellule hôte. Après dissolution de ces deux membranes (probablement par action de la phospholipase C, le pH n'étant pas suffisamment acide pour permettre à la LLO d'agir), le cycle peut recommencer (61). En restant dans le milieu intracellulaire, la bactérie échappe aux défenses immunitaire humorale.

Les mécanismes par lesquels la bactérie meurt ne sont pas connus : la présence de filaments d'actine est nécessaire, comme l'ont montré les expériences faites avec de la cytocholasine D (qui inhibe la polymérisation des filaments d'actine) (60-100) ainsi que les observation de cellules immunocompétentes : les cellules Caco 2 (139) ont montré que les bactéries perdent leur mobilité intracellulaire et leur capacité à passer de cellules à cellules (102). De plus, aucune accumulation de myosine (habituellement associée à l'actine dans les phénomènes de mobilité) n'est mise en évidence. La génération d'un mouvement pourrait alors

s'expliquer par la présence à la surface de la bactérie d'une protéine "myosine-like" ou d'une acting-binding protéine (139) .

Le même phénomène a été observé dans le cas de *Shigella flexneri*, bactérie pour laquelle une protéine intervenant dans les mouvements intra et inter-cellulaires est reconnue comme étant un facteur majeur de virulence .

Le réarrangement des filaments d'actine à un pôle de la bactérie servirait à "propulser" celle-ci vers la périphérie cellulaire : en effet, des mutants invasifs et hémolytiques mais ne pouvant se mouvoir, ont été obtenu (102) . Ces mutants, une fois libres dans le cytoplasme, restent vers le centre cellulaire et semblent recouverts d'une couche plus épaisse de filaments d'actine comme si le phénomène de polymérisation avait lieu, mais non celui de réorganisation . De plus, il existe *in vivo* une baisse importante de leur virulence par rapport à celle de la souche initiale, indiquant que le ou les facteur(s) permettant la mobilité intracellulaire sont nécessaires à l'expression de la virulence au même titre que la LLO ou l'internaline .

V . HEMOLYSINE

V . 1) CARACTERISTIQUES

L'hémolysine est une substance sécrétée par certaines souches de *Listeria* . Elle est soluble, filtrable, thermolabile et antigénique (20-137) . Elle peut entraîner une hémolyse totale ou partielle, selon les souches : les souches de *Listeria monocytogenes* isolées de pathologie humaine et animale sont toutes hémolytiques alors que la plupart des souches retrouvées dans l'environnement ne possèdent pas cette caractéristique (170) . L'hémolysine extra-cellulaire soluble décrite par Harvey et Faber (83) a été largement étudiée par de nombreux auteurs comme un facteur majeur dans l'expression de la virulence des *Listeria* (75-89-94-96-178) .

La listériolysine O (LLO) est une protéine de 58 Kd, sulfidryl-activée (4) formée de 929 acides aminés, ayant un point isoélectrique de 6,7 . Son activité est supprimée par oxydation ou par la présence de cholestérol et de l'antistreptolysine O (89-96) . Elle est augmentée par des agents réducteurs . Cette hémolysine est aussi cardiotoxique (177) . La listériolysine a été purifiée par Geoffroy et Coll en 1987 (67) . Elle possède les propriétés des toxines, des bactéries à Gram positif dont le prototype est la streptolysine O de *Streptococcus pyogenes* .

La sécrétion de la listériolysine sera d'autant plus forte que la teneur en fer du milieu est faible : la plupart des micro-organismes sécrètent des agents communément appelés sidérophores . Ils ont pour action de libérer le fer des réserves de l'organisme, principalement présenté dans les tissus par la transferrine . Ces réducteurs pourraient mobiliser le fer de la ferritine dans le cytoplasme cellulaire . Il est possible que la production de l'hémolysine soit nécessaire à cette étape car sa concentration est, *in vitro*, inversement proportionnelle à celle du fer dans le milieu . Ceci laisse à penser que, dans des conditions ferriprives, la production

d'hémolysine est importante afin d'avoir un relargage maximal d'hémoglobine à partir des globules rouges sanguins (134) .

L'activité enzymatique de la listériolysine est maximale à pH = 5,5 et n'est pas détectable à pH = 7 contrairement aux autres toxines SH-activées, plus actives à un pH supérieur à 6,5 (84) . Par le groupement SH de son unique cystéine, la listériolysine O se fixe au cholestérol de la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (179-183) . Cette fixation est indépendante de la température et n'aurait pas lieu lorsque la toxine est oxydée . La toxine interférerait avec le groupement hydroxyl du cholestérol et s'enfouirait dans la double couche lipidique par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes avec la chaîne aliphatique du cholestérol . Il y aurait formation d'oligomères circulaires ou semi-circulaires transmembranaires puis "déchirure" de la membrane cellulaire (9) entraînant des troubles de la perméabilité et finalement la mort cellulaire . Cette cytolysine permettrait aux bactéries d'être libres dans le cytoplasme et d'échapper aux mécanismes bactéricides des phagosomes (59) . Cette hypothèse semble confirmée par une étude récente de complémentation du génome de *Bacillus thuringiensis* par le gène *hly A* : ce germe à multiplication extracellulaire normalement capté et rapidement détruit par les macrophages, se libère de sa vacuole et se multiplie rapidement dans le cytoplasme; ce qui signifie par ailleurs que le cytoplasme représente un milieu favorable à la multiplication bactérienne . Par contre, *in vivo*, ce germe reste avirulent indiquant que la LLO n'est pas l'unique facteur de virulence et que l'introduction d'un seul gène ne peut suffire à transformer une bactérie en agent pathogène (197) . Dans le cas de la LLO, deux types de structures interviennent dans ce mécanisme d'action : une protéine tronquée de 48 acides aminés en C terminal secrétée par un mutant peut se fixer sur les membranes mais ne possède pas d'activité lytique, ce qui indiquerait qu'il existe une ou plusieurs structure(s) située(s) dans la partie tronquée formant un ou plusieurs site(s) spécifique(s) de lyse ou ayant un rôle conformationnel (190) . Dans le cytoplasme, la quête du fer libre stimulerait fortement la croissance bactérienne (182-183) .

Il est à noter que la comparaison des séquences en acide aminés de plusieurs cytolysines thiol-dépendantes (dont la LLO) a permis de mettre en évidence un peptide commun de 11 acides aminés, qui contient en outre le seul résidu cystéine de ces protéines (70-129). Ce peptide est situé en C-terminal, ce qui laisse penser qu'il joue probablement un rôle dans l'activité cytolitique de la protéine mais qu'à l'inverse il n'intervient pas dans l'interaction avec le cholestérol. Ceci est en accord avec les expériences de mutagenèse dirigées qui ont montré qu'une mutation au niveau du tryptophane en position 492 (acide aminé situé dans le peptide commun) provoque une diminution importante non seulement du caractère hémolytique mais également de la virulence *in vivo* (135).

A l'inverse, une mutation affectant l'unique résidu cystéine ne semble pas modifier l'activité de la molécule, résultat déjà obtenu pour d'autres protéines thiol-dépendantes (155).

Ces propriétés expliquent en très grande partie le rôle prépondérant joué par l'hémolysine dans la cascade d'événements conduisant à la lyse du macrophage suite à la multiplication intra-cellulaire de la bactérie (18-169).

La listériolysine est codé par le gène *hly A*, ce gène a été cloné puis séquencé (130-191). Par technique d'hybridation ADN-ADN, il est montré que ce gène est mis en évidence dans toutes les souches de *L.monocytogenes* ainsi que dans le génome des deux autres espèces hémolytiques, *Listeria ivanovii* et *Listeria seeligeri*. Il est à noter que, pour ces deux espèces, le profil des fragments de restriction et l'intensité d'hybridation semblent montrer qu'il existe des divergences dans la séquence de leurs gènes par rapport à celle de *hly A* (111-130).

L'importance de la listériolysine dans la virulence de *Listeria monocytogenes* a été démontrée par l'isolement de mutants non hémolytiques (79). Des souches non hémolytiques de *L.monocytogenes* ont été obtenues par l'insertion du transposon Tn1545 au sein de la souche NCTC 7973 de *L.monocytogenes* 1/2a hémolytique (35). De même, l'insertion du

transposon Tn 916 au sein de cette souche NCTC 7973 provoque une diminution de la production de listériolysine .

Dernièrement, il a été mis en évidence par GM . Matar et al (124) que de la listériolysine O provenant de *L.monocytogenes* sérotype 4b gardait 100 % de son activité hémolytique pendant 6 semaines stockée à -20°. Pour garder ce pouvoir hémolytique la LLO a été purifiée par passage sur colone d'affinité avec 0.1M d'acide acétique, 0.85 % de NaCl, pH=2,8 et collectée dans un tube contenant un tampon alcalin (5mM lysine, 140mM KCl, 50% éthylène glycol, pH = 11,5) .

De plus, une étude de la stabilité hémolytique montre que la LLO est plus stable dans le tampon diéthiothréitol placé à pH=8 dans une limite de 4 heures d'incubation . De même, il a été démontré que la LLO perd son activité hémolytique après 25 minutes d'incubation à 50°C (124) .

La quantité de LLO retrouvée dans les surnageants de culture de *L.monocytogenes* est variable selon les conditions de culture : le maximum (800 à 1500 HU/ml selon les souches) est obtenu en fin de phase de croissance exponentielle (8 à 10 heures de culture) et suivi d'une chute rapide en phase de croissance stationnaire (69) .

Ces résultats sont obtenus sur milieux de culture additionnés de charbon végétal ou traités par un chélateur d'ions divalents ce qui aurait pour effet de diminuer la concentration du milieu en fer et d'augmenter la production de LLO . Cette hypothèse provient du pouvoir hémolytique des surnageants de culture, et peut-être la quantité de LLO, qui augmente de façon inversement proportionnelle à la concentration en ion ferrique du milieu (42) .

Le même type de résultat est obtenu au niveau des surnageants de culture de *L.seeligeri* avec un maximum de 9 à 30 HU / ml, tandis que pour *L.ivanovii* la quantité maximale d'hémolysine (2500 HU / ml) est obtenu en 14 à 16 heures (quelque soit le type de milieu utilisé) et persiste plusieurs heures .

Aucune activité hémolytique n'est retrouvée dans les surnageants de culture des autres espèces de *Listeria* (69) .

V . 2) LISTERIOLYSINE ET IMMUNITE

V.2.a) Généralités

Cluff et Ziegler (38) ont montré que la production de listériolysine pouvait avoir une importance sur la réponse immunitaire (10-35) . De plus, il a été récemment possible de mettre en évidence que l'infection par une dose sub létale de bactéries vivantes entraîne une résistance aux effets létaux de la toxine purifiée, suggérant que la listériolysine O est sécrétée lors de l'infection naturelle, en quantité suffisante pour induire la synthèse d'anticorps neutralisants (96) mais le rôle de la listériolysine O comme antigène dans l'induction de la protection anti-*Listeria* reste à définir . En effet, cette toxine est capable, sous forme purifiée, d'induire une réaction d'hypersensibilité retardée chez la souris , avec une réactivité maximale à partir du sixième jour après la primo-infection (16-118) .

Chez l'homme, l'objectif reste la prévention de l'infection listérienne gravidique et néonatale pour améliorer le pronostic de la maladie jusque là réalisé par le dépistage systématique et la recherche bactériologique . Or, concernant ce pronostic des résultats prometteurs ont été obtenus récemment grâce au dépistage sérologique d'anticorps très spécifiques : les anti-listériolysines O (anti-LLO) (21) .

L.monocytogenes déclenche une immunité à médiation cellulaire plutôt qu'humorale chez la souris (118) . Ce phénomène a fait l'objet de nombreux travaux (54-92-147-193-200) .

Il semblerait qu'à l'instar des autres parasites à multiplication intracellulaire, la résistance acquise contre *L. monocytogenes* n'est pas due à la présence d'anticorps, mais à la production de lymphocytes T sensibilisés anti-*Listeria* (26) . A la suite des travaux expérimentaux de Mackaness (118) les principales étapes du développement de l'immunité contre *L.monocytogenes* sont actuellement mieux connues, en particulier chez la souris .

Il existe une phase d'induction de l'immunité, où les antigènes de *L.monocytogenes* sont présentés à la surface des macrophages infectés en association avec les molécules du complexe d'histocompatibilité, les molécules IA dans le cas de la souris (136) . La LLO inhibe la transformation et la présentation des antigènes par le macrophage (38) . La reconnaissance du complexe antigènes-IA par les lymphocytes spécifiques entraîne leur expansion clonale rapide grâce à la sécrétion d'interleukines par les macrophages (115-136). Cette phase nécessite la présence de bactéries vivantes métaboliquement actives (15-122-149) . En effet, il a été démontré que des cellules viables de *Listeria monocytogenes* stimulent plus la production de IL I que des cellules mortes (122) . Les lymphocytes T blastiques ainsi formés sécrètent des lymphokines, et notamment l'interféron γ (5-43) , qui serait capable de mobiliser et d'activer les macrophages recrutés dans les foyers infectieux (118-147-149), de même la production de TNF(Tumor Necrosis Factor) a un rôle prédominant dans l'élimination de la bactérie (29-95-141) . Par transfert cellulaire, ces blastes peuvent conférer une forte protection et un état d'hypersensibilité retardée à des souris receveuses, à condition que donneurs et receveurs partagent un certain nombre de gènes dans le complexe d'histocompatibilité ou en dehors de celui-ci (14-199) .

Les cellules phagocytaires effectrices acquièrent ainsi une capacité bactéricide très augmentée (macrophages activés) et contrôlent la prolifération bactérienne chez les sujets non immunodéprimés et infectés avec des doses faibles de bactéries . La prolifération blastique (lymphocytes T protecteurs) s'accompagne de la production de lymphocytes T mémoire et de lymphocytes T responsables de l'hypersensibilité retardée (148) . La présence de ces cellules T à longue vie expliquerait que les sujets infectés présentent une résistance acquise spécifique à *L.monocytogenes* (118) . Cette résistance n'est pas liée expérimentalement au sérotype infectant (193) . La diminution ou la destruction des lymphocytes T mémoire, ou des macrophages, chez les immuno déprimés pourraient expliquer la fréquence de infections chez ces malades .

Enfin, il a récemment été démontré par des expériences *in vivo* de déplétion des souris par des anticorps monoclonaux spécifiques des sous populations lymphocytaires, que les cellules T protectrices expriment le phénotype Lyt-2 (T₈) alors que les cellules T responsables de l'hypersensibilité retardée expriment le phénotype L₃T₄ (19-44-121-136) .

V.2.b) Chez le sidéen

Jacobs et Muray (88) ont émis certaines hypothèses afin d'expliquer en partie, un certain degré de protection du patient infecté par le virus du SIDA, vis à vis de *L.monocytogenes* .

Première hypothèse, un facteur épidémiologique : les patients séropositifs ont souvent recours à des cures d'antibiothérapie actives sur *Listeria* ce qui diminue ainsi leur exposition gastrique à *L.monocytogenes* .

Une influence génétique est également évoquée, en partant du postulat que les patients infectés par le VIH pourraient présenter une diminution d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II nécessaire à la présentation de l'antigène aux lymphocytes mais pas de celui de classe I dont l'expression serait normale . Ce dernier permettrait aux macrophages de présenter l'antigène aux lymphocytes T₈ actif sur *L.monocytogenes* (modèle expérimental chez la souris) (80-138) .

Une autre hypothèse serait l'intervention rapide (48 h) des macrophages et des polynucléaires qui constitueraient un mécanisme de défense non spécifique et fonctionnel chez le sidéen .

Une dernière explication est proposée par Jacobs et Muray (88) ; il s'agirait d'une sous-population de cellules T capable d'offrir une résistance anti -listérienne .

Kales (91) confirme l'activité des macrophages non activés par les lymphocytes sur la *Listeria* et l'existence, chez des souris immunodéprimées, d'interféron gamma produit par

des cellules autres que des lymphocytes T . Kaufmann (93) reprend les mêmes éléments que Kales et invoque également le rôle des lymphocytes T₈ pour conférer une immunité contre *L.monocytogenes* .

D'autres raisons peuvent concourir au faible nombre d'associations listériose et SIDA : Mascola (123) évoque des aspects pratiques à savoir la sélection des aliments ingérés par le sidéen éduqué et sensibilisé à sa maladie (éviter de manger des aliments crus); également, l'absence de publications de tous les cas d'associations diminue considérablement les données chiffrées sur le sujet .

V.3) RECHERCHE DE L'HEMOLYSINE

V.3.a) Camp-test traditionnel

La recherche de l'hémolysine par le Camp-test (37) avec *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi*, permet une identification rapide des cinq groupes génomiques .

Le Camp-test a été initialement décrit en 1944, pour les streptocoques du groupe B qui présentaient une accentuation de l'hémolyse au voisinage d'une culture de *S.aureus* producteur de toxine β (37) : cette épreuve d'accentuation de l'hémolyse est connue sous le nom de Camp-test .

Un phénomène voisin a été noté pour *L.monocytogenes* avec *Rhodococcus equi* par Fraser en 1962 (57) . L'application de cette technique pour les *Listeria* est préconisée par Brizin et Seeliger (27) pour une meilleure distinction entre les souches hémolytiques et non hémolytiques . Le Camp-test en présence d'une culture de *R.equi* permet de distinguer *L.ivanovii* des deux autres espèces hémolytiques (86-87) .

Dernièrement, Brizin et al. (28) ont décrit une similitude fonctionnelle entre *L.ivanovii* et *Staphylococcus aureus* pour le Camp-test avec *Streptococcus agalactiae* : un test additionnel en utilisant *S.agalactiae* est envisageable pour le diagnostic de *L.ivanovii* .

Quelques auteurs ont souligné l'importance d'utiliser des souches de référence pour réaliser le test , car certaines souches de *L.monocytogenes* peuvent se montrer hémolytiques au voisinage de *R.equi* (175-190) .

Le Camp-test avec *S.aureus* et *R.equi* est réalisé sur tryptose agar additionné de 5 % de globules rouges de mouton lavé et remis en suspension dans un volume d'eau physiologique à 8,5 ‰ égal au volume de sang initial . Les exosubstances prépurifiées : la β toxine de *S.aureus* et l'*equi* facteur de *R.equi*, d'activité connue, ont été appliquées parallèlement l'une à l'autre, sur la surface de la gélose au sang . Les souches de *Listeria* sont alors incubées, à angle droit par rapport aux lignes de ces exosubstances . La lecture est effectuée après 24 à 49 heures d'incubation à 37°C . On obtient des zones d'éclaircissement aux lieux d'hémolyses (33) .

C'est ainsi que l'on peut distinguer : *L.ivanovii*, *L.monocytogenes* et *L.seeligeri*. En effet, l'hémolyse de *L.ivanovii* est accrue près de la raie de *R.equi* alors que celles de *L.monocytogenes* et *L.seeligeri* sont accentuées dans la zone d'influence de la raie de *S.aureus* (147) .

V.3.b) Nouveau mécanisme du Camp-test

Il semblerait que la réaction du Camp-test avec *S.aureus* et *Corynebacterium equi* puisse être remplacé par une réaction impliquant la cholestérol oxydase de *Pseudomonas fluorescens* (CO_F) et *Brevibacterium brevis* (CO_B) .

En effet, l'hémolyse par les *Listeria*, des globules rouges contenu dans une gélose au sang de mouton, semble augmenté en présence de cholestérol oxydase de *P.fluorescens* ou de celle de *B.brevi* (Sigma chemical Co. St Louis , MO, USA) .

Les mécanismes possibles pour expliquer ce phénomène peuvent être :

1- Une ou plusieurs phospholipases spécifiques de *L.monocytogenes* peuvent participer simultanément avec la cholestérol oxydase pour hydrolyser les

phospholipides membranaires et permettre une meilleure lyse des globules rouges par les enzymes bactériens .

2- L'attachement de la lystériolysine O aux membranes des érythrocytes est favorisé par la présence de cholestérol oxydase (167) .

V.4) DETERMINATION DU POUVOIR HEMOLYTIQUE DE LA LLO

D'après les données de la littérature, les diverses unités de pouvoir hémolytique sont difficiles à comparer . Suivant les auteurs considérés, les paramètres dont dépendent les résultats varient de façon significative .

Ces différences portent essentiellement sur les facteurs suivants :

- a) La concentration en érythrocytes (0.45 à 1.25 %) ;
- b) La nature des érythrocytes : lapin, mouton, boeuf, dont on connaît la différence de sensibilité vis à vis de l'hémolysine (86) .
- c) Le volume total du mélange réactionnel du système ;
- d) La vitesse d'addition des érythrocytes et leur mode de mélange avec le système réactionnel, condition dont l'importance a été démontrée par Emar et Cochard (51) .

Le mélange LLO - globules rouges de mouton, doit ensuite incuber 1 heure à 37°C . Une centrifugation, à 1850 tr/minutes pendant 3 minutes, permet d'éliminer le culot d'érythrocytes lysés . La mesure de la densité optique de l'oxyhémoglobine libérée par la lyse des érythrocytes, est effectuée au spectrophotomètre avec un trajet optique à la longueur d'onde de 540 μm .

Les tampons utilisés sont variables suivant les auteurs :

1) D'après Alouf (3) un mélange de deux tampons est nécessaire :

Tampon I : HNa_2PO_4 , 12 H_2O	19,25 g
H_2NaPO_4 , 1 H_2O	3,5 g
NaCl	4,5 g
eau distillée	qsp 1000 ml

Tampon II : Sérum albumine (fraction V d'Armour)	0,1 g
Tampon I	100 ml

Cette solution est utilisée dans toutes les préparations comme diluant de la LLO . La sérum albumine est un agent stabilisateur (81-103) .

2) D'après Asao et al . (6) , le tampon est formé par :

Tris-HCl	0,01 M	
NaCl	0,9 %	pH= 5,5
Cystéine-HCl	0,02 M	

Dans les deux méthodes on retrouve l'utilisation de la cystéine à M/20 afin de réactiver la LLO par réduction .

3) Selon la méthode de Geoffroy et al (69) améliorée par G.M Matar et ces collaborateurs (124) :

Le tampon est alors formé de 0,01M de PBS (Phosphate buffered saline) pH=6,0 et de 0,1 % d'albumine de sérum bovin (BSA) . De plus, du diéthiothréitol (DTT) à la place de la cystéine améliorerait la réaction .

L'incubation serait de 45 minutes à 37°C et la centrifugation passerait à 2000 g pendant 10 minutes .

De plus, la lecture ne serait plus effectuée à 540 nm mais à 570 nm .

Quelque soit la méthode utilisée, on détermine l'unité hémolytique (HU) comme 50 % de la lyse total obtenu par incubation des cellules sanguines suivie d'un éclatement par de l'eau distillée (165) .

La quantité de LLO retrouvée dans les surnageants de culture de *L.monocytogenes* est variable selon les conditions de culture . Les meilleurs résultats sont obtenus sur milieux de culture additionnés de charbon végétal ou traités par un chélateur d'ions divalents ce qui aurait pour effet de diminuer la concentration du milieu en fer et d'augmenter la production de LLO (hypothèse due au fait que le pouvoir hémolytique des surnageants de culture, et peut-être la quantité de LLO, augmente de façon inversement proportionnelle à la concentration en ion ferrique du milieu) (42) .

VI. LES AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE .

VI. 1) PHOSPHATIDYL INOSITOIL SPECIFIQUE- PHOSPHOLIPASE C (PI-PLC)

La présence d'une phospholipase chez *L.monocytogenes* est connue depuis longtemps par l'existence d'une zone opaque sur gélose aux protéines de jaune d'oeuf (58) .

Une première étude a mis en évidence, en aval du gène *hly A* codant pour la LLO, une région appelée ORF-U d'orientation opposée à celle de *hly A* (131) .

Il a été montré que :

- des mutants touchant la région ORF-U peuvent affecter l'activité phospholipasique indiquant que cette région code pour une phospholipase ou régule son expression .

- des mutations localisées en dehors des régions *hly A* et ORF-U provoquent, selon leur localisation, soit une diminution seule de l'activité hémolytique due à la LLO, soit une diminution à la fois de l'activité hémolytique et phospholipasique impliquant l'existence de gène(s) intervenant dans l'expression de ces deux enzymes (180) .

Récemment, la région ORF-U a été identifiée comme étant le gène *plc A* (33) codant pour une protéine de 36 KD possédant une activité lytique calcium indépendante vis-à-vis du glycosyl phosphatidyl inositol (GPI), mais non vis-à-vis des phosphatidyl inositol phosphatases (132) . D'autre part, cette protéine présente des homologies avec le PI-PLC de *B. thuringiensis* et de *B. cereus* (151) .

L'étude de mutants *plc A* (-) a montré qu'ils présentaient une baisse de virulence associée à une diminution de l'activité hémolytique : cela confirmerait l'existence de gènes régulateurs communs à ces deux protéines (132) .

Certains types de cellules eucaryotes possèdent à leur surface des protéines liées à la membrane cellulaire par l'intermédiaire de GPI, leur permettant de résister à une attaque externe de micro-organismes : la PI-PLC n'étant retrouvée que chez les souches virulentes, elle pourrait jouer un rôle important dans l'interaction bactéries-cellules en lysant les GPI externes .

VI . 2) PHOSPHOLIPASE C (PLC)

Le gène *plc B* codant pour cette enzyme a été cloné et séquencé par l'équipe de Vasquez et al (190) .

C'est une protéine de 29 KD, qui serait sécrétée sous la forme d'un précurseur inactif de 33 KD, dont le point isoélectrique est de 8,4 . Elle possède une activité enzymatique de type lécithinase et sphingomyélinase mais qui ne lyse pas le phosphatidyl inositol, à l'inverse de la PI-PLC décrite ci-dessus (72) .

Elle n'est retrouvée que chez *L.monocytogenes* .

Son activité enzymatique est maximale pour des pH allant de 6 à 7 ; elle est zinc-dépendante, comme le PLC de *Clostridium perfringens* .

Elle possède également une activité hémolytique non calcium-dépendante s'exprimant tardivement (18 heures à 37°C) ; cette activité ne s'exprime pas vis-à-vis des globules rouges de mouton (GRM) qui ne possèdent pas de phosphatidyl choline, ce qui élimine une éventuelle interaction de la PLC au cours des tests d'hémolyse réalisés sur GRM avec la LLO .

Ces observations permettent de penser que la PLC pourrait se substituer à la LLO dans certains groupes cellulaires : en effet, la LLO est indispensable à la prolifération de

L.monocytogenes dans les macrophages et les fibroblastes murins mais non dans les cellules épithéliales et les fibroblastes humains (156) .

Les mutants produisant peu ou pas de LLO, mais possédant une activité phospholipasique, se multiplient (bien que plus lentement) dans les cellules épithéliales humaines en culture (180) .

L.ivanovii possède également une PLC mais sans activité de type lécithinase : de plus, son poids moléculaire est de 24-27 KD, il n'existe pas de cross-réactivité avec un sérum polyclonal anti-PLC de *L.monocytogenes* ce qui différencie ces deux protéines (71) .

Le rôle de la PLC dans la virulence de *L.monocytogenes* est actuellement à l'étude puisque seules les souches virulentes l'expriment, contrairement à la PLC de *C.perfringens*, elle n'est cependant pas toxique *in vivo* chez la souris .

VI. 3) METALLOPROTEASE

C'est une protéine, codée par le gène *mlp*, de poids moléculaire 34,5 KD et dont la structure présenterait trois sites de liaison avec le zinc .

Le gène *mlp* étant spécifique de *L.monocytogenes* et les promoteurs de gènes *hly A* (codant pour la LLO) et *mpl* ayant des structures communes, cette métalloprotéase pourrait intervenir comme facteur de virulence (133) .

Elle présente des homologies structurales avec les métalloprotéases d'autres bactéries comme les *Bacillus*, *Serratia* et *Legionella* .

Son activité protéolytique n'a pas encore été mise en évidence : les conditions permettant sa détection son actuellement à l'étude : les métalloprotéases sont synthétisées sous forme de proenzymes, le clivage donne naissance à la forme active et requiert peut-être des conditions particulières (133) .

VI. 4) PROTEINE P60

Le gène *iap* (pour invasive associated protéine) a été cloné et séquencé : il comporte des séquences répétées dans une région de 400 paires de bases qui serait spécifique de *L.monocytogenes* (98) .

Cette P60 a un poids moléculaire de 60 KD (101) .

Les mutants *L.monocytogenes* P60 (-) ont été isolés : ces mutants auraient perdu leur capacité à envahir des fibroblastes de souris . Ils présentent des modifications morphologiques importantes (196) : phénotype rude ou "rough", apparition de longues bactéries par déficience dans la formation de septa .

La protéine P60 aurait donc un rôle dans l'interaction cellules-bactéries; les mutants ayant une morphologie très altérée, et ne présentant pas de baisse de virulence *in vivo*, il paraît difficile d'apprécier le rôle de cette protéine (180) .

VI. 5) INTERNALINE

Par utilisation d'une lignée cellulaire "enterocyte-like" (lignée Caco 2), il a été démontré que seules les souches virulentes de *L.monocytogenes* et de *L.ivanovii* ont la capacité d'entrer dans des cellules non phagocytaires, indiquant l'existence d'un processus spécifique nécessaire à ce phénomène (61-101) .

Récemment, trois mutants obtenus par insertion d'un transposon dans une même région du génome de *L.monocytogenes* se sont révélés être incapables de pénétrer dans plusieurs types cellulaires ; ils présentaient probablement un déficit au niveau d'une ou plusieurs étapes communes à l'invasion de ces cellules (64) .

Ces mutants ne présentent aucune autre différence avec la souche initiale (morphologie des colonies, activité phospholipasique, production d'hémolysine, mobilité et caractères biochimiques identiques), indiquant qu'ils diffèrent des mutants "rough" définis précédemment (101)

La région d'insertion du transposon est appelée *inl* pour internaline . En induisant le gène *inl A* isolément dans le génome d'une espèce non invasive (*L. innocua*), il a été montré qu'il intervenait dans le phénomène d'invasion puisqu'il permet à lui seul de transformer *L. innocua* en une bactérie invasive pour les cellules Caco 2 (64) .

Le gène *inl A* code pour une protéine de poids moléculaire 95 KD, appelée internaline et retrouvée dans les surnageants de culture de *L. innocua* exprimant le gène *inl A* .

Cette protéine possède en C-terminal une région riche en proline qui pourrait représenter une séquence d'ancrage, et sa région N-terminale présente des séquences répétitives . Son point isoélectrique est de 4,44 . Elle se différencie de l'invasine isolée chez les bactéries à Gram négatif (comme *Yersinia pseudotuberculosis*) ainsi que de la P60 (101) .

En microscopie électronique avec immuno-marquage à l'or, il est montré que l'internaline est située à la surface des bactéries, confirmant son rôle dans l'interaction bactérie-cellule . Par contre, elle ne possède pas de séquences spécifiques de la fibronectine ou des ligands extracellulaires en général mais, comme dans le cas de l'invasine de *Y. pseudotuberculosis*, elle pourrait représenter un ou plusieurs récepteurs appartenant à la famille des intégrines .

L'internaline présente des parentés structurales avec la protéine M de *Streptococcus pyogenes* : ces deux espèces étant génétiquement proches, il est possible d'émettre l'hypothèse selon laquelle les deux germes auraient subi une évolution divergente aboutissant à un mode de multiplication intra ou extra cellulaire . Cette hypothèse serait une hémolysine (SLO ou LLO) structurellement très proche (64) .

VI. 6) PREPHENATE DEHYDRATASE

Dernièrement, un mutant de *L. monocytogenes*, déficient en préphénate déshydratase, enzyme qui agit sur la biosynthèse de phénylalanine, montre une diminution de virulence chez la souris . De plus, un vaccin contenant ce mutant, peut protéger des souris contre une infection grave à *L. monocytogenes* (1) .

TRAVAUX PERSONNELS

A la suite d'études épidémiologiques, réalisées au laboratoire Départemental d'Analyse et de recherche de la Haute-Vienne, de nombreuses souches sauvages ont été isolées à partir de différents types d'aliments destinés à la consommation humaine .

Dans notre étude expérimentale, nous avons sélectionné quatre souches sauvages de *Listeria* appartenant à différentes espèces et à différents serovars . Nous avons adapté, en microméthode, un protocole de mesure, *in vitro*, de l'activité hémolytique de l'hémolysine sur une suspension d'hématies de mouton .

Nous décrirons successivement, de la mise au point en microméthode du titrage de l'activité . Les résultats obtenus seront discutés et comparés à ceux cités dans la littérature .

I. MATERIEL ET METHODES .

I.1) MATERIEL

a. Origine des souches sauvages

Nous avons choisi quatre espèces de *Listeria* réparties de la façon suivante :

- une souche de *L. monocytogenes* serovar 4b,
- une souche de *L. ivanovii* serovar 5,
- une souche de *L. innocua* serovar 6a
- une souche de *L. seeligeri* serovar 3b .

SOUCHES	ESPECES	SEROVARS	ORIGINES
362	<i>L. monocytogenes</i>	4b	Avorton ovin
94415	<i>L. ivanovii</i>	5	Cerveau d'agneau
2138	<i>L. innocua</i>	6a	Steak haché surgelé
55009	<i>L. seeligeri</i>	3b	Eau

Tableau 1 : Souches de *Listeria* spp. étudiées

Les serovars ont été déterminés au Centre National de Référence des *Listeria* (CHR Nante) .

La souche de *L.monocytogenes* serovar 4b (souche 362) a été isolée d'un avorton de brebis . L'animal provenait d'un troupeau de mouton en partie disséminé par une listériose .

b. Les souris

Nous avons utilisé des souris Swiss, femelles, d'un même lot, provenant de l'élevage DEPRE (St Douchart, France) pesant de 20 à 25 grammes .

Elles sont maintenues dans des cages en plastique, sur des copeaux de bois, avec un libre accès à l'eau et à la nourriture . Elles sont nourries par de l'aliment prêt à l'emploi (Extralabo Longueville France) .

Pendant la durée de l'expérimentation les cages sont entreposées dans l'animalerie à température stable .

c. Produits chimiques et milieux de culture

Milieux de culture :

Les milieux utilisés pour la culture des *Listeria* ont été :

- Gelose trypticase soja

. hydrolysate tryptique de caseine	15gr	
. peptone de soja	5gr	
. NaCl	5gr	(pH = 7,3
. Agar	15gr	15 min à 121°C)
. H2O D qsp	1000 ml	

- Bouillon coeur-cervelle (BHI, Labo. Difco Detroit Mich. USA)

. Infusion de cervelle de veau	200 gr	
. Infusion de coeur de boeuf	250 gr	
. Peptone de gelatine	10 gr	(pH = 7,4
. NaCl	5 gr	15min à 121°C)
. Phosphate disodique	2.5 gr	
. Glucose	2 gr	
. H ₂ O D qsp	1000 ml	

Remarque : Conformement aux normes internationales, la teneur en Ca = 50 à 100 mg/ml
et la teneur en Mg = 25 à 35 mg/ml .

Tampon :

La solution utilisée pour tamponner les globules rouges de mouton à 50 %
contient :

- 0,01 M de tri-HCl anhydre (Labo Sigma Chemical Co)
- 0,9 % de chlorure de sodium (Labo Sigma Chemical Co)
- 0,02 M de L.cystéine HCl monohydraté (Labo Sigma Chemical Co)
- eau distillé qsp 1000 ml

Le pH final est ajusté à 5,5 .

Dans ce tampon ont été réalisées les dilutions du surnageant de culture et les dilutions de
globules rouges de mouton .

Réactifs et milieux d'identification :

L'identification biochimique des *Listeria* a été réalisée à partir des réactifs et milieux suivants :

- **H₂O₂ à 10 volumes** afin de mettre en évidence l'action des catalases .

Elles favorisent la dégradation de l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux .

Cette enzyme a une grande importance pour les bactéries puisqu'elle empêche une accumulation d'H₂O₂, dont l'action serait létale pour les germes .

- **Papier Pathote-Co** : il met en évidence une cytochrome oxydase (dernière enzyme intervenant dans la phosphorylation oxydative) nommée phénylène-diamine-oxydase .

Elle agit sur le substrat incolore (diméthyl-para-phénylène diamine), entraînant la formation d'une semi-quinolone bleue .

- **Milieu Clark et Lubs** :

~ *Réaction de Voges-Proskauer* :

Cette réaction met en évidence la fermentation du glucose par la voie butylène glycol . Certaines bactéries sont capables de produire de l'acétylméthylcarbinol (AMC ou acétoïne). En présence de base forte, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné .

~ *Réaction au rouge de méthyle (RM)* :

Elle consiste à mettre en évidence l'acidification finale d'un milieu glucosé après fermentation du glucose . Cet indicateur est rouge à un pH inférieur à 5 et jaune à un pH supérieur à 5,8 .

- Gélose nitrate :

Cette réaction permet la recherche des nitrates-réductases . Ces enzymes provoquent la réduction des nitrates en nitrites, qui seront révélés par de l'acide sulfanilique et de l'alpha-naphtylamine .

- Milieu de Ferguson :

Ce milieu aboutit à la mise en évidence de l'hydrolyse de l'urée grâce à une uréase. De plus, dans ce milieu est riche en tryptophane, la recherche d'une tryptophane désaminase capable de désaminer et d'hydrolyser le tryptophane jusqu'au stade indole est révélé par le réactif de Kovacs .

- Gelose profonde viande-foie (VF) :

Elle permet de déterminer le type respiratoire .

- Milieu de Kligler :

Ce milieu confirme la fermentation du glucose (avec ou sans production de gaz), et d'étudier l'attaque du lactose et la production d'H₂S .

- Gelose au sang de mouton :

Elle permet d'observer la production ou non d'hémolysine .

- Hydrolyse de l'esculine

Recherché sur gélose à l'esculine .

- Recherche de la production d'acide

A partir du D-xylose, du L-rhamnose et du alpha-méthyl-D-mannoside la production d'acides est recherchée, afin de permettre la différenciation des groupes génomiques.

- "API *Listeria*" :

Le laboratoire bio Mérieux a mis au point une galerie permettant d'identifier rapidement et facilement toutes les espèces de *Listeria*, quelle que soit l'origine du prélèvement (alimentaire, clinique, environnement) . Cette galerie possède 10 tests biochimiques sélectionnés pour le genre *Listeria* , ce qui permet d'identifier même les bactéries les plus atypiques . De plus, " l'API *Listeria* " identifie 5 espèces différentes de *Listeria* : *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* .

d. Matériel

Les manipulations réalisées au cours de la mise au point du protocole de recherche de l'activité hémolytique ont nécessité l'utilisation du matériel suivant :

- Centrifugeuse Beckman Model J-21B ;
- Centrifugeuse Jouan CR312 ;
- Spectrophotomètre (Stalabo) ;
- Microplaque autoreader EL 311 ;
- Microplaques (Labo Dynatech Fraissiner) ;
- Micropipettes (Gilson) ;
- Tubes à hémolyses stériles ;
- Tubes Beckman de 10 ml .

I.2) METHODES

a. Préparation des inoculum

Sur gélose TSAensemencées, l'aspect des colonies est repéré par leur aspect bleuté en lumière transmise .

Chaque souche de *Listeria* estensemencée dans un bouillon BHI (10 ml) . Après 18 h à 37 °C, le bouillon est réparti dans des tubes Beckman de 10 ml , centrifugé pendant 15

minutes à 7000 rpm , dans la centrifugeuse Beckman Model J-21B . Le culot de centrifugation est repris dans de l'eau physiologique à 8,5 ‰ stérile, et le volume final est ajusté de manière à obtenir une concentration bactérienne comprise entre 10^8 et 10^9 UFC / ml , soit 10% de lumière transmise à 620 nm après lecture au spectrophotomètre . Chaque suspension bactérienne est dénombrée sur TSA , pour contrôler le nombre de *Listeria* par ml .

b. Dénombrement de l'inoculum

A partir d'une solution mère de *Listeria* on réalise une série de dilutions de 10 en 10 dans de l'eau physiologique à 8,5 ‰ stérile .

Le dénombrement peut se faire selon deux méthodes :

-soit un dénombrement dans la masse :

0,1 ml de chaque dilution est déposé dans une boîte de pétri . On coule 20 ml de gélose TSA à 40°C . Après solidification des géloses on incube 18h à 37°C . Le dénombrement des colonies est exprimé en unité formant colonie (UFC) /ml de la solution mère .

-soit un dénombrement en surface :

A la surface de géloses TSA en boîtes de pétri, 0.1 ml de chaque dilution sera étalé "en rateau", puis mise à incuber à 37°C pendant 24h . Les résultats sont exprimés comme précédemment en UFC / ml .

c. Injection des inoculums aux souris

Les souris Swiss sont infectées par voie intrapéritonéale (IP) .

L'inoculum est de : - 0,5 ml de solution mère de la souche 362, soit 4×10^7 UFC / ml

- 0,7 ml de solution mère de la souche 2138, soit $2,5 \times 10^8$ UFC / ml

- 1 ml de solution mère de la souche 94415, soit $1,3 \times 10^8$ UFC / ml

- 1 ml de solution mère de la souche 55009, soit $38,5 \times 10^8$ UFC / ml

d. Prélèvement des organes

Après 48h les animaux sont tués par dislocation cervicale . Le foie et la rate sont recueillis stérilement et pesés .

Remarque : ces organes peuvent être congelés, des études réalisées au laboratoire ont montré que la congélation ne modifie pas le nombre de germes dans les organes (1-134) .

e. Dénombrement des bactéries sur le foie et la rate

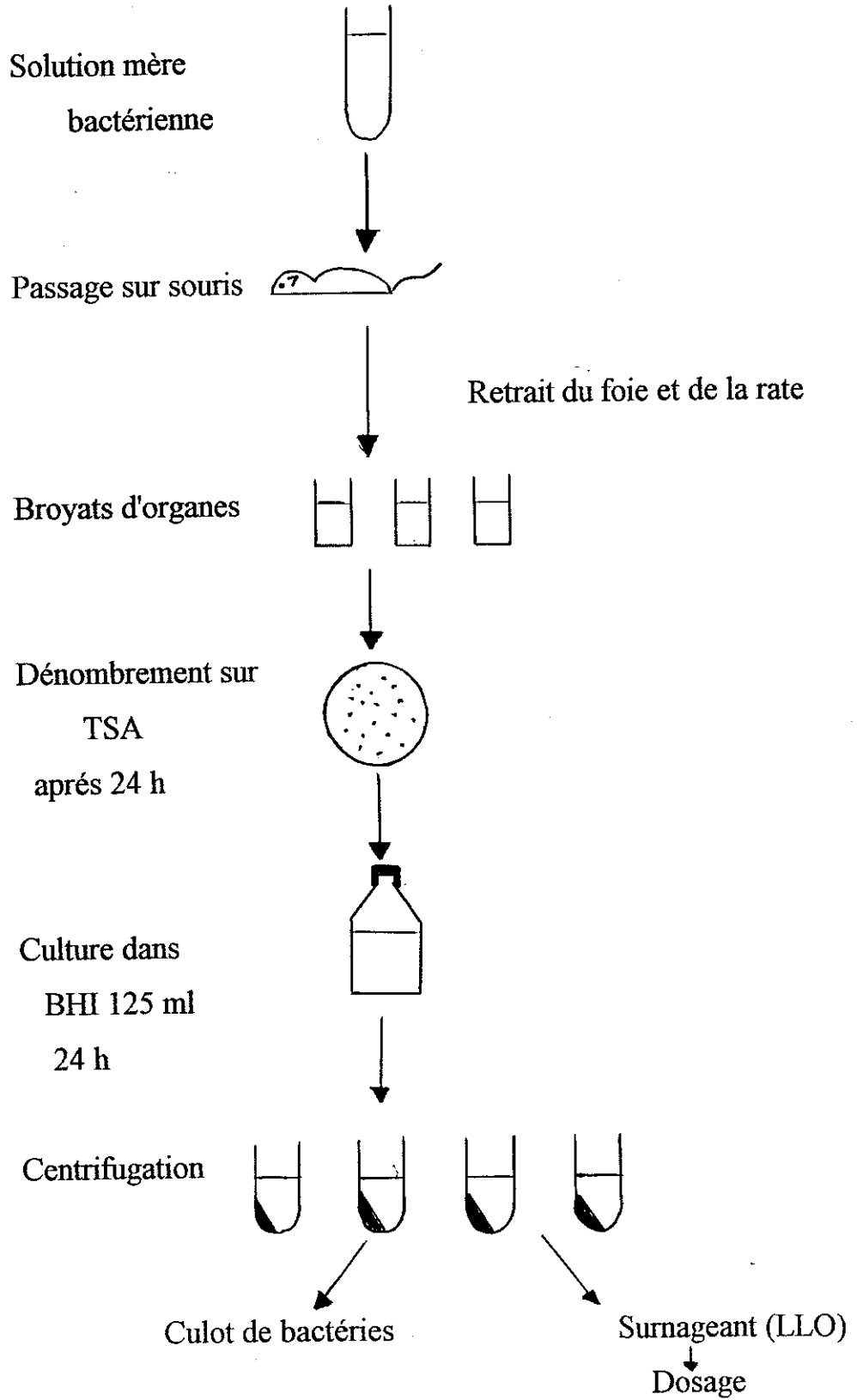
Chaque organe est broyé dans un broyeur de Potter stérile, à raison de 8 ml d'eau physiologique stérile pour le foie et 2 ml pour la rate .

Après homogénéisation , chaque broyat est successivement dilué dans de l'eau physiologique à raison de 10 . 0,1 ml de chaque dilution est étalée à la surface d'une gélose TSA .

Les colonies sont dénombrées après 24 à 48 h d'incubation à 37°C .

Chaque résultat est exprimé en UFC / gramme d'organe . Le seuil minimum de détection des germes par cette méthode est d'environ 100 UFC / gramme d'organe .

Protocole :



f. Extraction de l'hémolysine

A partir des colonies obtenues après réactivation de la virulence sur la souris, on effectue un ensemencement dans un milieu BHI de 125 ml . Après 18 à 24 h à 37°C nous réalisons :

- d'une part, le dénombrement des bactéries après dilution de 10 en 10 et ensemencement sur TSA . La lecture est faite après 24 h d'incubation à 37°C . Chaque résultat est exprimé en UFC / ml de solution mère .

- d'autre part, le BHI restant est centrifugé, dans des tubes Beckman stériles de 10 ml, à 11000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans la centrifugeuse Beckman .

Le surnageant est récupéré, puis filtré sur des filtres Ministart NML millipore de 0.2 µm, ne retenant pas les protéines .

Le filtrat est réparti en aliquot de 1 ml, puis conservé congelé à -20°C .

g. Mesure de l'activité hémolytique contenue dans le surnageant de culture

L'activité hémolytique de la listériolysine vis à vis des globules rouges de mouton est déterminée selon la méthode de Asalo & al (6) modifiée, soit en tubes à hémolyses, soit en microméthode .

Pour cela, nous avons utilisé des hématies de mouton à 50 % de chez bio Mérieux. Les globules rouges sont centrifugés à 1500 tr/min pendant 20 minutes . Le culot est lavé deux fois dans du PBS (phosphate buffer saline) à pH = 7,2 et repris par des quantités égales au surnageant retiré afin de conserver une suspension à 50 % . Après la dernière centrifugation le culot est repris par du tampon tris-cystéine . A partir de cette solution de globules rouges lavées à 50 % on réalise avec le tampon, des dilutions de globules rouges à 4%, 3 %, 2 %, 1,5 % .

Les aliquots de surnageant bactérien décongelé sont dilués dans du tampon tris-cystéine, afin d'obtenir différentes concentrations d'hémolysine .

Dans des **tubes à hémolyse** on mélange les différentes concentrations d'hématies et de surnageants bactériens selon les proportions indiquées tableau 5 .

Le blanc sera obtenu par mélange de 1 ml de surnageant pur et 1 ml de tampon .
Il servira également pour déterminer le 0 % de lyse .

Le 100 % de lyse sera obtenu par mélange de 1 ml de globules rouges et de 1 ml d'eau pur .

(Tableau 5)

TABLEAU 5 :

Tableau des dilutions réalisées en tube à hémolyse

(GR) DF	2%	1,5%	1%	0,75%
1/2	1ml de GR à 4% + 1ml de surnageant pur	1ml de GR à 3% + 1ml de surnageant pur	1ml de GR à 2% + 1ml de surnageant pur	1ml de GR à 1,5% + 1ml de surnageant pur
1/4	1ml de GR 4% + 1ml de surnageant 1/2	1ml de GR à 3% + 1ml de Surnageant 1/2	1ml de GR à 2% + 1ml de surnageant 1/2	1ml de GR à 1,5% + 1ml de surnageant 1/2
1/512	1ml de GR 4% + 1ml de surnageant 1/256	1ml de GR à 3% + 1ml de surnageant 1/256	1ml de GR à 2% + 1ml de surnageant 1/256	1ml de GR à 1,5% + 1ml de surnageant 1/256
Blanc	1ml de tampon + 1ml de surnageant pur	1ml de Tampon + 1ml de surnageant pur	Idem	Idem
100%	1ml de GR 4% + 1ml d'eau pur	1ml de GR à 3% + 1ml d'eau pur	1ml de GR 2% + 1ml d'eau pur	1ml GR 1,5% + 1ml eau pur

DF : DILUTION FINALE

Les différentes séries de tubes ainsi obtenues sont mises à incuber au bain-marie à 37°C pendant 1 heure . Puis, on centrifuge à 1850 tr/min pendant 3 minutes .

Une première lecture, à l'oeil nu, des différents tubes permet d'apprécier l'activité hémolytique de la lysteriolysine de chaque souche, en relation avec les différentes concentrations de globules rouges testés .

Afin d'améliorer les résultats, la même opération est réalisée sur **microplaques**. Dans chaque puits, on mélange les différentes concentrations d'hématies et de surnageant bactérien de la manière suivante :

(Tableau 6)

TABLEAU 6 :

Tableau des dilutions réalisées sur microplaque

(GR) Dilution FINALE	1,5%	1%	0,75%
1/2	90µl de GR à 3% + 90µl de surnageant pur	90µl de GR à 2% + 90µl de surnageant pur	90µl de GR 1,5% + 90µl de surnageant pur
1/4	90µl de GR 3% + 90µl de surnageant 1/2	90µl de GR 2% + 90µl de surnageant 1/2	90µl de GR 1,5% + 90µl de surnageant 1/2
1/512	90µl de GR 3% + 90µl de sur. au 1/256	90µl de GR 2% + 90µl de sur. au 1/256	90µl GR 1.5% + 90µl de sur. au 1/256
Blanc	90µl de tampon + 90 µl de surnageant pur	Idem	Idem
100%	90µl de GR 3% + 90µl Eau pur	90µl de GR 2% + 90µl Eau pur	90µl GR 1,5% + 90µl Eau pur

Les microplaques sont incubées 1 h au bain-marie à 37 °C . La centrifugation des microplaques est effectuée sur la centrifugeuse Jouan CR 312 à 1850 tr/min pendant 3 minutes . Le surnageant est observé à 540 nm au spectrophotomètre " microplaque autoreader EL 311" .

Les tests sur microplaques sont réalisés plusieurs fois, dans les mêmes conditions, pour chaque souche afin d'évaluer la reproductibilité . L'ensemble des mesures obtenu permet, pour chaque dilution, de déterminer une densité optique (DO) moyenne et un écart-type .

A partir de ces résultats une courbe est tracée pour chaque souche exprimant le Log de 10 des dilutions en fonction des DO .

La DO obtenue avec le 100 % de lyse des globules rouges permet de déterminer, par proportionnalité, la DO de 50 % de lyse . Cette DO 50 est reportée sur la courbe afin de mettre en évidence le Log de 10 de la dilution correspondante . Ce résultat correspond à la valeur de l'unité hémolytique (UH) . En effet, l'unité hémolytique représente la quantité de toxine nécessaire pour obtenir 50 % de lyse des érythrocytes .

h. Etudes des différents paramètres

Nous avons fait varier plusieurs paramètres pour mesurer leur influence sur l'activité de l'hémolysine .

Ces essais sont effectués avec les **souches 362 ou 94415**, en **tubes à hémolyse** .
La solution de **globules rouges initiale** utilisée est à **2 %** .

La filtration :

Deux séries de 10 tubes à hémolyse ont permis de comparer en parallèle l'activité du surnageant filtré sur filtre de 0,2 µm à celle du surnageant non filtré .

Série N°1 : réaction effectuée avec un surnageant filtré .

Série N°2 : réaction avec un surnageant non filtré .

Influence du pH :

L'activité hémolytique a été testée sur 3 séries de 10 tubes avec 3 tampons de pH différents :

- un tampon tris-cystéine à pH : 2
- le tampon tris-cystéine à pH : 5,5
- le tampon tris-cystéine à pH : 8

Nature du tampon :

Le rôle du tampon est démontré en utilisant 2 séries de 10 tubes à hémolyse contenant :

- soit un tampon tris-cystéine pH : 5,5 ,
- soit de l'eau physiologique stérile à 8,5 ‰

Composition du tampon :

Dans trois séries de 10 tubes à hémolyse on met :

Série N°1 : manipulation avec un tampon tris-cystéine, pH : 5,5 normal

Série N°2 : utilisation d'un tampon cystéine sans tris HCl , pH : 5,5

Série N°3 : réaction effectuée avec un tampon tris sans cystéine, pH : 5,5

II . RESULTATS

Dans un premier temps nous avons contrôlé les caractères biochimiques des quatre espèces étudiées : *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, *L.innocua* et *L.seeligeri* .

Dans un deuxième temps, comparativement aux données bibliographiques, nous avons mis au point un protocole permettant de doser l'activité hémolytique des surnageants de culture de *Listeria* .

II.1 IDENTIFICATION DES SOUCHES ETUDIEES

Chaque souche utilisée est identifiée par l'étude de ses caractères biochimiques .

a. Caractères d'identification classique

Sur gélose TSA les *Listeria* poussent en donnant de petites colonies, translucides, gris-bleu caractéristiques en transillumination oblique .

A la coloration de Gram, ce sont de petits bacilles à Gram positif de forme régulière, courts, à bouts arrondis, isolés ou présentant un arrangement en palissade et en lettres comme les corynébactéries .

Ils sont non sporulés, non capsulés .

Les quatre espèces étudiées se caractérisent par les réactions suivantes :

- catalase +
- oxydase -
- nitrate réductase -
- rouge de méthyle +
- Voges Proskauer +
- indole -
- urée -

- aérobie-anaérobie facultatif
- mobilité : + à 22°C
- à 37°C

b. Caractères de différenciation

Les résultats des épreuves de différenciation des souches étudiées sont rapportés dans le tableau 7 .

La production d'acide à partir de D-xylose apparaît en 1 à 4 jours, à la différence de celle obtenue à partir du L-rhamnose et du alpha-méthyl-D-mannoside qui est plus rapide (1 à 2 jours) .

La souche de *L.monocytogenes* présente un Camp-test avec *R.equi* négatif ainsi qu'une production d'acide à partir du L-rhamnose et du alpha-méthyl-D-mannoside .

La souche de *L.ivanovii* diffère de *L.monocytogenes* par des réactions négative avec le L-rhamnose et l'alpha-méthyl-D-mannoside , et un Camp-test positif .

L.immocua présente une réaction positive avec l'alpha-méthyl-D-mannoside et variable avec le L-rhamnose .

Enfin, *L.seeligeri* présente une hémolyse spontanée mais avec une réaction au Camp-test à *R.equi* négative .

TABLEAU 7 :

Différenciation des espèces de *Listeria*

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

v : caractère variable

II.2. DENOMBREMENT DES GERMES DANS LES ORGANES

Les expériences réalisés, nous ont permis d'observer une forte colonisation des organes par *L.monocytogenes*, *L.ivanovii*, et *L.innocua* ; alors que, *L.seeligeri* ne colonise pas le foie et très faiblement la rate . Cette souche de *L.seeligeri* ne sera pas retenu pour la suite des manipulations, du fait de son manque de virulence après passage sur la souris .(Tableau 8)

Tableau 8 :

Espèces	Dose injectée (UFC/ml)	Temps	Foie (UFC/gr)	Rate (UFC/gr)
<i>L.monocytogenes</i> 4b (362)	4×10^7	24h	$4,4 \times 10^6$	$4,5 \times 10^8$
<i>L.ivanovii</i> 5 (94415)	$1,3 \times 10^8$	24h	$8,4 \times 10^5$	9×10^6
<i>L.innocua</i> 6a (2138)	$2,5 \times 10^8$	24h	$6,5 \times 10^4$	2×10^6
<i>L.seeligeri</i> (55009)	$38,5 \times 10^8$	48h	0	150

II.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE HEMOLYTIQUE DES SURNAGEANTS DE CULTURE DE *LISTERIA*

Les différents essais que nous avons réalisés, nous ont permis de déterminer la concentration optimale de chaque réactif et d'adapter notre protocole en microméthode .

a. Recherche de la concentration optimale en globules rouges de mouton

Les expériences réalisées avec les surnageants de culture de *L.monocytogenes* 4b, en **tubes à hémolyses** nous ont permis de sélectionner, à l'oeil nu, 4 concentrations de globules rouges de mouton : 2 %, 1,5 %, 1 %, 0,75 % .

Cependant, avec la concentration finale de 2 %, nous obtenons toujours, après centrifugation, un culot résiduel de globules rouges, même aux plus fortes concentrations en hémolysine . Lors de l'adaptation en microméthode, cette concentration de globules rouges ne sera donc pas retenue .

Les concentrations de 1,5 % ; 1 % ; 0,75 % sont étudiées ensuite **sur microplaques** : avec une concentration finale de 1,5 % de globules rouges nous obtenons des résultats comparables à la concentration à 2 %, mais les culots d'hématies sont moins importants . En effet, le 100 % d'hémolyse, qui sert de témoin, est encore illisible à 540 nm .

La concentration finale à 0,75 % en globules rouges met en évidence : un surnageant d'hémolyse lisible à 540 nm, mais avec des valeurs en densité optique très faibles ; et un culot hématique apparaît seulement dans les puits de concentration faible . Cette concentration en globules rouges de mouton ne sera pas retenue pour la suite des tests .

Enfin, avec une concentration finale à 1 % en globules rouges nous avons obtenu des résultats plus faciles à interpréter . En effet, le culot de globules rouges n'apparaît pas dans les premiers cupules, puis il apparaît très faiblement et augmente proportionnellement au fur et à mesure que la concentration en hémolysine du surnageant bactérien diminue ; la lecture est lisible à 540 nm .

Nous avons donc adopté pour la suite des expérimentations une **concentration finale à 1 % en globules rouges** .

b. Influence de la filtration du surnageant de culture bactérienne

A partir d'un surnageant d'une culture bactérienne de *L.monocytogenes* 4b, on a réalisé deux lots de surnageant : l'un filtré, l'autre non filtré . Le premier lot montre une hémolyse totale jusqu'à une dilution de 1/4 . Au 1/8 un très léger culot de globules rouges apparaît .

Le surnageant non filtré donne une hémolyse totale à partir de la dilution au 1/2 ; un léger culot apparaît à 1/4 .

L'absence de filtration semble donc diminuer l'activité hémolytique de la solution préparée . C'est pourquoi nous avons utilisé pour la suite des expérimentations un surnageant bactérien filtré .

c. Rôle de la solution tampon utilisée

Nous avons recherché l'influence de la composition du tampon et de son pH sur l'activité hémolytique des surnageants . Les essais ont été réalisés sur les surnageants de la souche 94415 de *L.ivanovii* en microméthode .

L'utilisation de l'eau physiologique stérile à 8.5 ‰ à la place du tampon tris-cystéine a mis en évidence une activité hémolytique beaucoup plus faible . En effet, avec le tampon tris-cystéine nous avons obtenu une hémolyse jusqu'au 1/256, alors qu'avec l'eau physiologique utilisé comme tampon, l'hémolyse ne dépasse pas une dilution de 1/64 .

Une couleur presque verte du surnageant est obtenue aux fortes concentrations d'hémolysine avec le tampon tris-cystéine pH 5,5; elle n'apparaît pas avec l'eau physiologique comme tampon .

Plusieurs réactions semblables, faites à 24, 48 et 72 h d'intervalle, avec la même préparation de tampon tris-HCl, conservée à 4°C, montre une baisse du pH dans le temps; malgré un réajustage de celui-ci, on note une diminution de l'activité hémolytique . Le maximum d'activité est noté le jour même de la fabrication du tampon . C'est pourquoi nous avons conservé la solution tampon au congélateur sous forme d'aliquot de 15 ml . Cette technique a permis d'effectuer plusieurs séries de réactions reproductibles, décallées dans le temps .

Nous avons observé une absence d'activité hémolytique lorsque le pH du tampon est inférieur ou égal à 2 et supérieur ou égale à 8 . **Le maximum d'activité est obtenu avec un pH de 5,5 .**

En absence de tris-HCl dans le tampon, l'hémolyse est visible jusqu'au 1/16 alors que la réaction effectuée avec un tampon tris-HCl-cystéine complet montre une hémolyse totale jusqu'à 1/256 .

En absence de L-cystéine aucune hémolyse apparaît . **La L-cystéine a donc un rôle important dans l'activation de la listériolysine .**

La solution dans laquelle sont vendues les globules rouges à 50 % (bio Mérieux) empêche la lyse totale en présence d'eau pure (témoin 100 % d'hémolyse) . C'est pourquoi nous avons centrifugé et lavé dans du PBS les globules rouges, avant de les reprendre dans le tampon tris-cystéine afin d'obtenir le 100 % d'hémolyse .

La quantité de globules rouges présente dans la solution après lavage est vérifiée par numérations sur cellule de Malassez . Puis, la solution utilisée est réajustée à 50 % de globules rouges dans le tampon tris-cystéine .

d. Coloration finale des solutions

Avec la souche de *L.ivanovii* serovar 5 fortement hémolytique, nous avons remarqué une hémolyse d'un rouge variable selon la concentration en substance hémolytique . En effet, une couleur verte est obtenue dans les tubes contenant une forte activité hémolytique.

Cette coloration est visible jusqu'au 1/32 . Une couleur semblable a été noté dans le tube contenant la dilution au 1/2 du surnageant de *L.monocytogenes* 4b souche 362 .

e. Dosage de l'activité hémolytique en microméthode .

A partir d'un même surnageant de *Listeria* stocké sous forme d'aliquots congelés nous avons réalisé, et adapté, plusieurs fois les essais pour chacune des deux souches hémolytiques : *L.monocytogenes* 4b et *L.ivanovii* 5 (Tableaux 9 et 10) .

Les valeurs de DO obtenues diminuent progressivement, en fonction des dilutions de surnageant, et proportionnellement à la quantité d'hémolysine présente . Pour chaque essai le 100 % d'hémolyse a été déterminé .

Pour faciliter l'interprétation, nous avons choisi d'exprimer les résultats des différents essais, en calculant la moyenne des DO obtenue pour chaque dilution de surnageant et de 100 % en traçant une courbe semi-Log (figures a et b) .

Les courbes obtenues montrent les variations de DO à 540 nm, en fonction du Log 10 des dilutions . A partir de ces droites on a déterminé la dilution de surnageant correspondant à 1 UH .

Ainsi, le surnageant de culture de *L. monocytogenes* 4b contient 1 UH à la dilution du surnageant égale à 1/4 : le surnageant pur possède donc une quantité de listériolysine O (LLO) égale à 4 UH / 90 µl soit **44 UH / ml** .

Le surnageant de culture de *L. ivanovii* 5 montre 1 UH à une dilution de 1 / 129 , soit 129 UH / 90 µl ou **1434 UH / ml** .

***L. innocua* n'est pas hémolytique .**

TABLEAU 9 :

Dosage de l'activité hémolytique de *L.monocytogenes*

Dil.	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64		100%
Log DO	3,16	1,778	1,333	1,1547	1,0746	1,0366		
	0,955	0,681	0,236	0,035	0,018	0,011		0,975
	0,947	0,738	0,243	0,037	0,014	0,005		0,774
	0,852	0,709	0,316	0,034	0,005	0,007		0,775
	0,880	0,682	0,321	0,043	0,013	0,005		1,006
	0,800	0,674	0,427	0,063	0,013	0,005		1,003
Moyenne	0,886	0,697	0,308	0,0424	0,012	0,0064		0,9066
E.T	0,058	0,024	0,069	0,011	0,0043	0,0025		0,108

Figure a :

Courbe d'activité hémolytique : *L.monocytogenes*

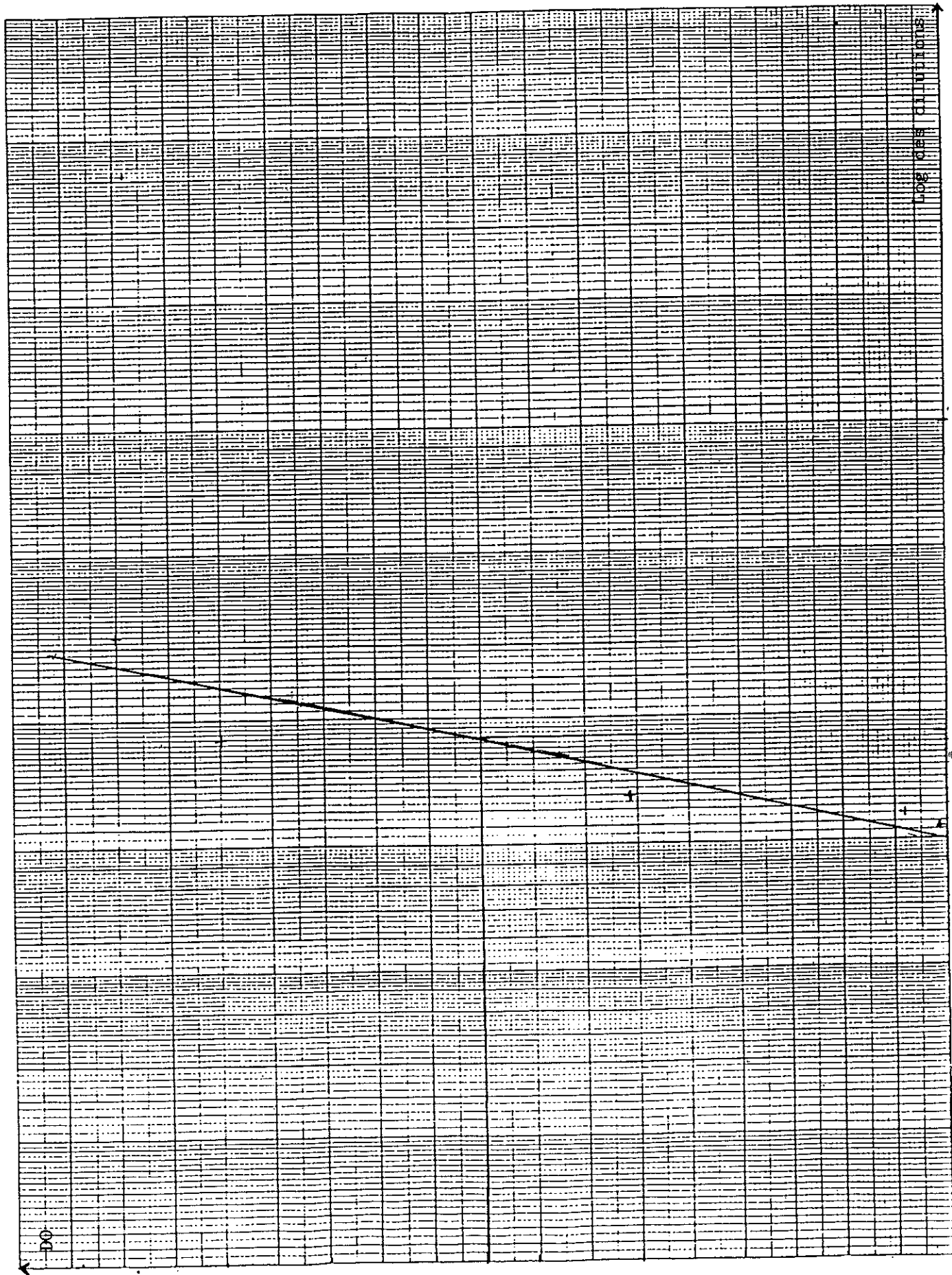


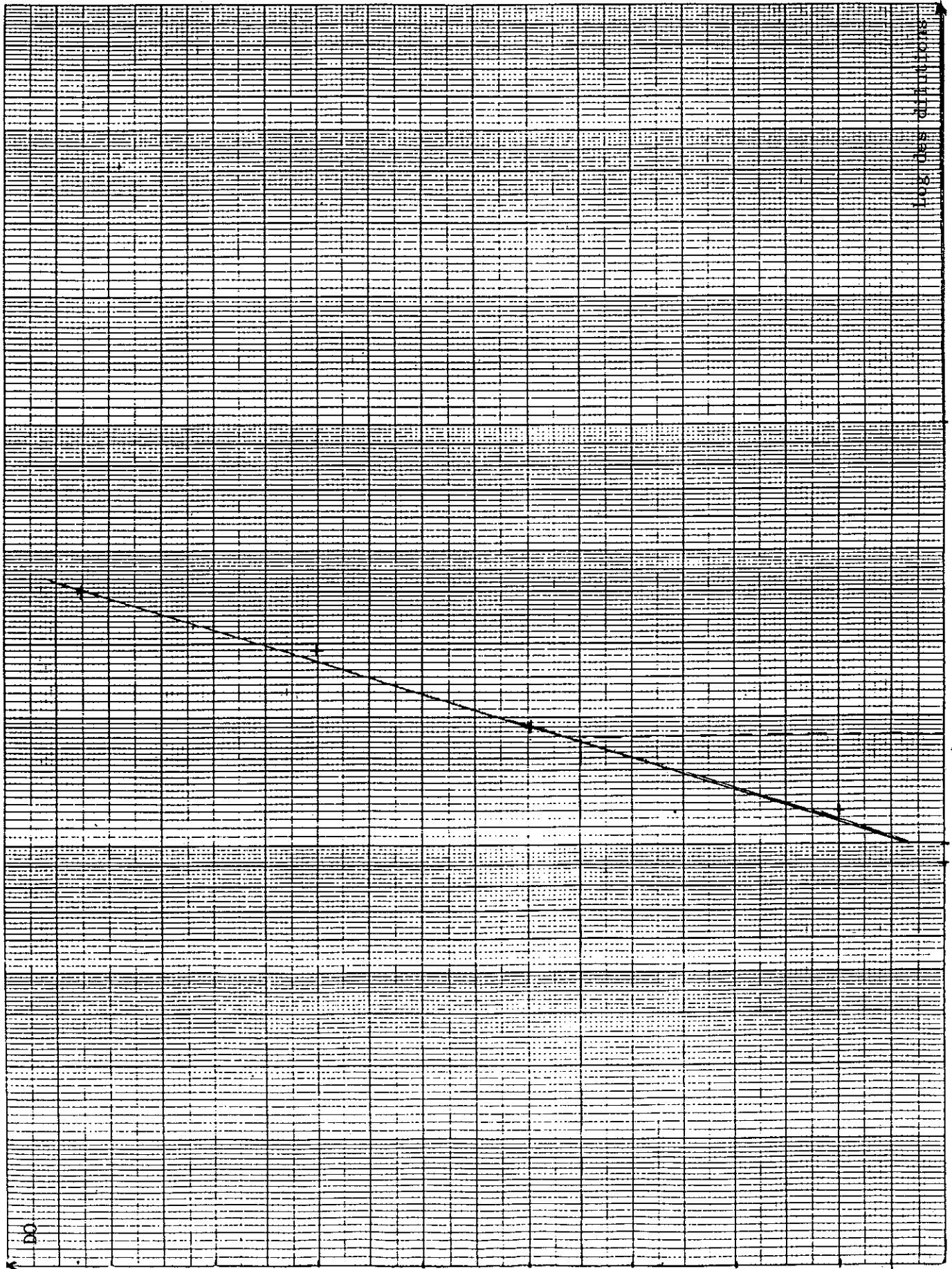
TABLEAU 10 :

Dosage de l'activité hémolytique de *L.ivanovii*

Dil.	1/60	1/80	1/120	1/160	1/240	1/320	1/480	1/640	100%
Log DO	1,039	1,029	1,019	1,0145	1,0096	1,007	1,0048	1,0036	
	0,859	0,643	0,358	0,106	0,066	0,020	0,002	0,002	0,975
	0,934	0,620	0,469	0,169	0,100	0,031	0,014	0,006	0,774
	0,806	0,617	0,466	0,167	0,099	0,023	0,011	0,003	0,775
	1,039	0,850	0,577	0,300	0,142	0,075	0,024	0,012	1,006
	1,026	0,830	0,580	0,279	0,137	0,036	0,013	0,009	1,003
Moyenne	0,9328	0,712	0,49	0,2042	0,1088	0,037	0,0128	0,006	0,9066
E.T	0,091	0,105	0,08	0,0735	0,0279	0,0198	0,007	0,0037	0,108

Figure b :

Courbe d'activité hémolytique : *L.ivanovii*



III . DISCUSSION

Nous avons étudié la virulence des *Listeria* en recherchant l'activité d'un facteur: l'hémolysine (LLO) .

La LLO est une protéine enzymatique, produite par un certain nombre de souches de *Listeria* ; elle leur confère un pouvoir hémolytique souvent en relation avec leur virulence . Nous avons constaté que toutes les espèces de *Listeria* n'ont pas le même pouvoir hémolytique. En accord avec la littérature, nous confirmons que ***L.ivanovii* serovar 5 est plus hémolytique que *L.monocytogenes* serovar 1/2a, et que *L.innocua* n'a aucune activité hémolytique** . Il a été démontré qu'au sein d'un même serovar, les souches de *Listeria* n'ont pas le même pouvoir hémolytique : pour le serovar 1/2a il est apparu que certaines souches sont fortement hémolytiques (Fh) et d'autres sont faiblement hémolytiques (fh) (134) . Le but de ce travail a donc été d'adapter, une technique en microméthode, pour doser l'activité de la listériolysine O (LLO) produite par des **souches sauvages** isolées d'aliments .

Afin d'obtenir une technique d'analyse plus précise et plus reproductible nous avons mis au point un protocole de mesure en modifiant certains paramètres décrits par Robert et al (166) . En microméthode, l'appréciation de l'hémolyse par lecture des DO au spectrophotomètre est plus précise et plus reproductible qu'en macrométhode . Nous avons utilisé des globules rouges de mouton provenant du laboratoire bio Mérieux dans le but de standardiser le réactif . Une préparation d'hématies provenant de sang de mouton est moins métrisable, dans la mesure où certains éléments liés à l'animal peuvent varier . De plus, nous avons constaté qu'un lavage de ces globules rouges était nécessaire de manière à éviter l'interférence du diluant . En utilisant le tampon tris-cystéine comme diluant des globules rouges, et en contrôlant le nombre d'hématies, nous avons amélioré le 100 % de lyse, élément essentiel pour déterminer le nombre d'unité hémolytique de la LLO .

En accord avec Robert (166) une concentration de globules rouges égale à 1 % donne des résultats mesurables au spectrophotomètre sauf pour les concentrations élevées en hémolysine où un verdissement du surnageant perturbe la lecture de la DO . Ceci pourrait

provenir d'une forte libération d'hémoglobine qui subirait une dégradation soit au contact de l'air, ou de la chaleur du bain-marie, ou bien en présence d'une hème-oxygénase dans le surnageant de culture . L'hème-oxygénase est microsomale (rate, foie, macrophage) et peut permettre la transformation de l'hème en biliverdine avec libération d'oxyde de carbone et de Fe^{3+} . C'est pourquoi, avec la souche de *L.ivanovii* 94415 seuls les résultats à partir de la dilution 1/60 sont exploitables en DO.

Nous avons montré que la filtration du surnageant est nécessaire de manière à éliminer les débris bactériens présents en suspension et de clarifier le milieu pour améliorer le rendement .

Les tests permettant d'étudier l'influence de la composition du tampon sur l'efficacité de l'hémolyse, ont montré que l'utilisation de l'eau physiologique comme solvant de dilution, provoque une perte d'activité hémolytique par rapport aux résultats obtenus avec le tampon tris-cystéine . L'analyse bibliographique décrit la LLO comme une enzyme thiol-dépendante . La présence du groupement R-S-R' améliore l'expression de l'hémolysine . **Le tampon tris-cystéine par la présence de cystéine, joue le rôle d'activateur .**

Lors de la préparation du tampon nous nous sommes heurtés à des problèmes de conservation . En effet, le tampon se conserve au maximum 24h à 4°C, durée au delà de laquelle nous observons une dégradation de la L.cystéine . Cette dégradation se caractérise par l'apparition d'une odeur désagréable, d'une augmentation de pH et une perte de l'effet activateur de la réaction . Les phénomènes observés semblent correspondre à une désamination désulfurante de la cystéine, qui libère alors de l'acide pyruvique et du H_2S . C'est pourquoi le tampon a été réparti en aliquots conservés à -20°C . Dernièrement, GM. Matar et al (124) suggèrent le remplacement de la cystéine par du diéthiothreitol (DTT) ce qui améliore la conservation du tampon et donc son action sur le pouvoir hémolytique .

Les différents essais que nous avons réalisés en préparant un diluant sans tris-HCl montrent une diminution de l'activité hémolytique . **Le tris-HCl joue le rôle de tampon en favorisant la stabilité du pH** . Différents auteurs ont affirmé qu'une amélioration de la solution tampon pourrait être réalisée en remplaçant le tris-HCL par une solution de PBS et d'albumine de sérum bovin (BSA) (124) .

En accord avec les données bibliographiques, le pH joue un rôle déterminant dans la réaction puisque nous avons constaté une absence d'hémolyse à des pH très faibles (<2) ou très forts (>8) et une diminution de l'activité hémolytique pour des pH qui s'éloignent de 5 ou de 6 . Cependant, GM. Matar et al (124) ont mis en évidence un maximum d'activité hémolytique à un pH de 8 pour une LLO provenant de *L.monocytogenes* 1/2a et 4b, en modifiant la composition du tampon .

Le dosage du facteur hémolytique des souches testées met en évidence la forte activité hémolytique de *L.ivanovii* et, par contre, l'absence totale de production de LLO par *L.immocua* . Ces résultats confirment ceux précédemment décrits dans la bibliographie, avec des souches de référence . Les proportions sont comparables, bien qu'inférieurs . La faible activité de l'hémolysine que nous avons obtenu peut être expliquée par l'utilisation de surnageants de culture obtenus après 24h d'incubation du BHI ; hors, Geoffroy.C et al (69) ont montré que la quantité maximum de LLO était obtenu après des temps de culture variable suivant chaque souche : 8 à 10h pour *L.monocytogenes* et *L.seeligeri*, 14 à 16h pour *L.ivanovii* . La production de listériolysine est liée à la courbe de croissance . Les activités plus faibles que nous avons obtenues peuvent provenir d'une lecture à 540 nm . Bien que conforme à la bibliographie, une longueur d'onde à 540 nm semble remise en cause par certains auteurs (124) qui ont préféré **une lecture à 570 nm** . Enfin, de nombreuses publications montrent une amélioration des résultats grâce à une purification de la LLO par passage sur colonne (124) .

***L.monocytogenes* a une activité hémolytique de 44UH/ml** . Au cours du dosage on constate une chute d'activité brutale dans la zone de dilutions située entre 1/4 et 1/16 (= zone critique) . ***L.ivanovii* a une activité hémolytique de 1434UH/ml** . La "zone critique" de dosage se situe entre 1/80 et 1/160 . Au vue des différents résultats, les écarts types sont faibles, pratiquement pour tous les dosages ce qui montre la reproductibilité de la méthode, et qui justifie le calcul des moyennes . Cependant, il apparait une difficulté de lecture lorsque la lyse est trop importante, c'est ainsi que le 100 % montre un écart type plus fort .

Nos expérimentations ont montré que l'expression de l'activité hémolytique de la LLO varie en fonction de nombreux paramètres . La maîtrise des différents facteurs réactionnels a permis d'améliorer le rendement du dosage .

Conclusion

Le dosage de l'activité hémolytique des trois souches de *Listeria* testées nous permet d'affirmer qu'il n'y a pas de relation directe entre le nombre d'unités hémolytiques et la virulence d'une espèce de *Listeria* puisque *L.ivanovii* a une activité hémolytique supérieure à *L.monocytogenes* .

Les différents paramètres : composition du tampon de dilution, temps optimal d'incubation des bactéries, choix de la longueur d'onde pour la lecture des DO, sont des facteurs encore très controversés par la littérature .

Cette technique de dosage serait d'un intérêt majeur pour mettre en évidence, et comparer l'activité de l'hémolysine de différentes souches de *Listeria* appartenant à une même espèce et à un même serovar . En effet, le travail d'A.Ménudier (134) a démontré que la virulence de certaines souches de *L.monocytogenes* sur la souris swiss varie pour un même serovar (1/2 a) .

L'originalité de ce travail à été de déterminer l'activité hémolytique de souches sauvages isolées de pathologies animales ou d'aliment, alors que les données bibliographiques utilisent des souches de référence .

Il serait intéressant de faire la relation entre l'origine de la souche, sa virulence *in vivo* sur la souris, et le dosage de l'activité de l'hémolysine *in vitro* .

BIBLIOGRAPHIE

1. ALEXANDER B.M., ANDREW P.W., JONES D. & ROBERTS I.S.
Characterization of an aromatic amino acid dependent *listeria monocytogenes* mutant :
attenuation, persistence and immunity . *Infect. Immun.*, 1993, 61, 5, 2245-2248 .

2. AL.GHAZALI M.R. & AL.AZAWI S.K.
Effets of sevrage traitement on the removal of *Listeria monocytogenes* .
J. Appl. Bacteriol., 1988, 65, 203-208 .

3. ALOUF J.E., VIETTE M., CORVAZIER R. & RAYNAUD M.
Préparation et propriétés de sérums de chevaux antistreptolysine O .
Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1965, 108, 476-500 .

4. ALOUF J.E. & GEOFFROY C.
Structure activity relation-ships in sulfhydryl-activited toxins .
Academic Press., London, 1984, 165-171 .

5. ANDRE P.
Listériose en Belgique . Données épidémiologiques de 1985-1991 .
Listeria et Sécurité Alimentaire, 1991, 58-59 .

6. ASALO T., KINOSHITA Y., KOZAKI S. & UEMURA T.
Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin .
Infect. Immun. , 1984, 46, 122-127 .

7. AUBERTIN J.
Quelques aspects de la pathologie infectieuse régionale en France . *B.E.H.*, 1975, 7-17 .

8. AUDURIER A.
Listeria . *Bacteriol. MED.*, Flammarion, Paris, 1982, 559-569 .

9. BAKDI S., JENSEN T. & SZEIGDEIT A.
Mechanism of membrane damage by Streptolysin O . *Infect. Immun.*, 1985, 47, 52 .

10. BARRY R.A., BOUWER H.G.A., PORTNOY D.A. & HINRICHS D.J.
Pathogenicity and immunogenicity of *L.monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread . *Infect. Immun.*, 1992, 60, (4), 1625-1632 .

11. BEAMAN B.L., BLACK C.M., DOUGHTY F. & BEAMAN L.
Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides* : importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils . *Infect.Immun.*, 1985, 47, 135-141 .

12. 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 .

13. BEHR'S VERLAG G. & CO
"Food borne listeriosis" .
Proceedings of a symposium on september 7, 1988 in Wiesbaden, FRG, Hamburg, 1989 .

14. BERCHE P. & NORTH R.J.
No H-2 restriction of expression of passively transferred delayed sensitivity .
J. Exp. Med., 1982, 155, 1334-1343 .

15. BERCHE P., GAILLARD J.L. & SANSONETTI P.
Intracellular growth of *L.monocytogenes* as a prerequisite for *in vivo* induction of T-cell-mediated immunity . *J. Immunol.*, 1987, 138, 2266-2271 .

16. BERCHE P., GAILLARD J.L., GEOFFROY C. & ALOUF J.E.
T-cell recognition of listeriolysin O is induced during infection with *Listeria monocytogenes* .
J. Immunol., 1987, 139, 3813-3821 .

17. BERCHE P., GAILLARD J.L. & SANSONETTI P.
Towards a better understanding of the molecular mechanisms of intracellular growth of
L.monocytogenes . Ann. Inst. Pasteur Microbiol., 1987, 138, 242-246 .

18. BERCHE P. & GAILLARD J.L.
Physiopathologie de la listériose humaine . Rev. Prat., 1989, 36, (17), 1507-1509 .

19. BERCHE P., DECREUSEFOND C, THEODORU I. & STIFFEL C.
Impact of genetically regulated T-cell proliferation on acquired resistance to *L.monocytogenes*.
J. Immunol., 1989, 132, 932-939 .

20. BERCHE P., REICH K.A., BONNICHON M. & VERON M.
Detection of anti-LLO for serodiagnostic of human listeriosis . Lancet., 1991, 335, 642-627 .

21. BERCHE P.
Detection of anti-LLO for serodiagnostic of human listeriosis .
App. Environ. Microbiol., Lancet, 1990, 97,(20), 79-80 .

22. BERTHIER A.M. & SOUSTRE Y.
Listeria , listériose . Technique et biologie. 1988, 3, 112-117 .

23. BESNIER J.M.
Aspects cliniques de la listériose .
Les dossiers du praticien, 1992, 172, 17-25 .

24. BORTULUSSI R., ISSEKUTZ A. & FAUTKNER G.
Opsonization of *Listeria monocytogenes* type 4b by human adult and new born sera .
Infect. Immun., 1986, 52, 493-498 .
25. BREER C.
Listeria in cheese .
Vet. Med. Hefte, 1987, 5, 106-109 .
26. BROCKE S., CHAKRABORTY T. & MOHASSEB I.
Protective immunity and granulomatous inflammation is mediated *in vivo* by T-cells reactive to epitopes common to avirulent and lysteriolysin-negative mutants of *Listeria monocytogenes* .
Cell. Immunol., 1992, 140, (1), 43-53 .
27. BRZIN B. & SEELIGER H.P.R.
A brief note on CAMP phenom on in *Listeria* .
In Problems of listeriosis, 1975 (WOODBINE M. eds.) Leicester university Press .
28. BRZIN B., KUCHAR N., NAVERZNIK B. & VADNJAL A.
Functional similarity of *Listeria ivanovii* and *Staphylococcus aureus* in CAMP-test .
Zbl. Bakt., 1990, 273, 179-183 .
29. BUCHANAN R.L., STAHL H.G. & ARCHER D.L.
Improved plating media for simplified, quantitative detection of *L.monocytogenes* in foods .
Food Microbiol., 1987, 4, 269-275 .
30. BUCHMEIER N.A. & SCHREIBER R. D.
Requirement of endogenous gamma interferon production for the resolution of *L.monocytogenes* infection . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, 82, 7404-7408 .

31. BUSCH S.V. & DONNELLY C.W.

Development of a repair-enrichment broth for resuscitation of heat injured *L.monocytogenes* et *L.innocua* . Appl. Environ. Microbiol. , 1992, 58, 1, 14-20 .

32. CAMILLI A. & TILEY L.G.

Dual role of plCA in *L.monocytogenes* pathogenesis .
Mol. Microbiologie , 1993, 8, 1, 143-157 .

33. CHAKRABORTY T. & GOEBEL W.

Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes* .
Current Topic in Microbiology and Immunologie, Vol. 188 , 1988, 41-58 .

34. CHAKRABORTY T., LEIMEISTER-WACHTER M. & DOMANN E.

Coordinate regulation of virulence genes in *L.monocytogenes* requires the product of the prfA gene . J. Bacteriol., 1992, 174, 2, 568-574 .

35. CHARKRABORTY T. & GOEBEL W.

Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes* .
Current Topics Microbiol. Immunol., Vol. 138, 1988, 41-58 .

36. CERUBIN C.E., APPLEMAN M.D. & HESELTINE P.N.R.

Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis .
Rev. Infect. Dis. ,1991,13, 1108-1114 .

37. CHRISTIE R., ATKINS N.E. & MUNCH-PETERSEN E.

A note on a lytic phenom on shown by group B streptococci .
Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci., 1944, 22, 197-200 .

38. CLUFF C.W., GARCIA M. & ZIEGLER H.K.

Intracellular hemolysin . Producing *L.monocytogenes* strain inhibit macrophage-mediated antigen processing . Infect. Immun., 1990, 58, (11), 3601-3612 .

39. COTTEREAU P. & LAVAL A.

Les aspects cliniques de la listériose chez les animaux domestiques et de laboratoire .
Bull. Soc. Sci. Vet. et Med. comparé, Lyon, 1972, 6, 74-76 .

40. 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 .

41. COURTIEU A.L. & REYNAUD A.E.

L.monocytogenes et listérioses humaine . La lettre de l'infectiologue, 1987, 2,(6),210-214 .

42. COWART R.E. & FOSTER B.G.

The role of iron in the production of hemolysin by *L.monocytogenes* .
Current Microbiol., 1981, 6, 287-290 .

43. CURTIS G.D.W., MITCHELL R.G., KING A.F. & GRIFFIN E.J.

A selective differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* .
Lett. Appl. Micobiol., 1989, 8, 85-98 .

44. CZUPRYNSKI J. & BROWN J.F.

Effects of purified anti-lyt-2 mAb treatment on murine listeriosis : comparative role of lyt-2⁺ and L3T4⁺ cells in resistance to primary and secondary infection, delayed-type hypersensitivity and adoptive transfer of resistance . Immunol., 1990, 71, 107-112 .

44a. DE CHASTELLIER C. & BERCHE P.

Fate of *L.monocytogenes* in murine macrophages : evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria . Infect. Immun., 1994, 62, 2, 543-553 .

45. DIJKSTRA R.G.

The occurrence of *Listeria* canals and lakes, in ditches of one big polder and in the effluents and canals of a sewage treatment plant .

Zbl. Bakt. Hyg., I Abt. Orig. B., 1982, 176, 202-205 .

46. DOMINGUEZ RODRIGUEZ L. GARAY ZABAL J.F.F. & VASQUEZ BOLAND J.A.

Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine . Can. J.Microbiol., 1985, 31, 938-941 .

47. DONNELLY C. & BAIGENT G.J.

Method for flow cytometric detection of *L.monocytogenes* in milk .

Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52, 689-695 .

48. DREAN J.P., JOUEN F., LEROUX A., DUVAL C. & BOIRON H.

Recherche de *Listeria monocytogenes* dans les placentas prélevés en salle de travail .

Nouv. Press. Med., 1974, 3, 2561-2562 .

49. DUMAS-ASTIER M.

Mise au point : Listérioses . Med. et Nut., 1992, 28, (6), 332-333 .

50. DURET P.

Thèse : Listériose et SIDA . Fac.de Med. Lariboisière St Louis Paris 7. 1991 .

51. EMAR A. & COCHARD M.

Ann. Biol. Clin., 1961, 16, 579 .

52. FARBER J.M., JOHNSTON M.A., PURVIS U. & LOIT A.

Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp .

Int. J. Food. Microbiol., 1987, 5, 157-163 .

53. 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 .

54. FARR A., KIELY J. & UNANUE E.

Macrophage T-cell interactions involving *L.monocytogenes*-role of the H-2 gene complex .

J. Immunol., 1979, 122, 1870-1876 .

55. FASSI-FEHRI M.

Les maladies infectieuses du mouton . Editions Actes , 1988, Tome1 .

56. FENLON D.R.

The influence of gaseous environment and wather availability on the growth of *Listeria* .

Microbiol. Aliment. Nutrition, 1989, 7, 165-169 .

57. FRASER G.

A plate method for the rapid identification of *L.monocytogenes* . Vet. Rec., 1962, 74, 50-51 .

58. FUZY M. & ILLIS I.

Production of opacity in egg-yolk medium by *L.monocytogenes* .

Nature (London), 1962, 195-196 .

59. GAILLARD J.L., BERCHE P., MOUNIER J. & SANSONETTI P.

Penetration and intracellular growth of *L.monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line

CaCo 2 : an *in vitro* model of pathogenesis . Infect. Immun., 1987, 55, 2822-2829 .

60. GAILLARD J.L., BERCHE P., MOUNIER J. & SANSONETTI P.

In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte like Caco-2 . Infect. Immun., 1987, 55, 2822-2829 .

61. GAILLARD J.L., BERCHE P., MOUNIER J., RICHARD S. & SANSONETTI P.

Penetration of *Listeria monocytogenes* into the host : a crucial step of the infectious process .
Ann. Inst. Pasteur / Microbiol., 1987, 138, 259-264 .

62. GAILLARD J.L., BERCHE P., FREHEL C. & COSSART P.

Entry of *Listeria monocytogenes* into mammalian cells is mediated by internalin, a protein reminiscent of surface antigens from Gram positive extracellular pathogens .
Cell, 1991, 65, 1127-1141 .

63. GALLAGHER P.G. & WATANAKUNAKORN C.

Listeria monocytogenes endocarditis : a review of the literature 1950-1986 .
Scand. J. Infect. Dis., 1988, 20, 359-368 .

64. GALSWORTHY S.B.

Role of the cell surface in virulence of *L.monocytogenes* .
Ann. Inst. Pasteur. Microbiol., 1987, 138, 273-276 .

65. GALSWORTHY S.B.

Monocytosis producing activity from virulent and avirulent strains of *Listeria* . Acta
Microbiologica Hungarica, 1990, 37, 97-99 .

66. GAUTHIER M. & DUFOUR C.

Listeria : qu'en est-il ? R.I.A. , 1989, 421, 35-40 .

67. GELLIN G.B. & BROOME C.

Le point sur la listériose . *Jama*, 1989, 14, (184), 627-637 .

68. GEOFFROY C., GAILLARD J.L., ALOUF J.E. & BERCHE P.

Purification, characterisation and toxicity of the sulfydryl-activated hemolysin O
L.monocytogenes . *Infect. Immun.*, 1987, 55, (7), 1641-1646 .

69. GEOFFROY C. & GAILLARD J.L.

Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species .
J. Gen. Microbiol., 1989, 135, 481-487 .

70. GEOFFROY C., MENGAUD J., ALOUF J.E. & COSSART P.

Alveolysin, the thiol-activated toxin of *Bacillus alvei* is homologous to listeriolysin O,
perfringolysin O, pneumolysin, streptolysin O and contains a single cystein .
J. Bact., 1990, 172, 7301-7305 .

71. GEOFFROY C., RAVENEAU J., BERETTI J.L., ALOUF J.E. & BERCHE J.E.

Purification and characterisation of an extracellular 29 kilodalton phospholipase C from
L.monocytogenes . *Infect. Immun.*, 1991, 59, (7), 2382-2388 .

72. GEORGES C.

Les méningoencéphalites listériennes . *Conc. Med.*, 1976, 98, 2433-2438 .

73. GEABEL W., KATHARIOU S., KUHN M. & SOKOLOVIC Z.

Hemolysin from *Listeria* . *Biochemistry, genetics and function in pathogenesis* .
Infection, 1988, 16, suppl.2, 149-156 .

74. GILBERT R.J.

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in foods in United Kingdom .

Listeria et sécurité alimentaire, 1991, 82-88, Laval., France .

75. GIRARD K.F., SHARRA A.J. & BARDAWIL W.A.

Serology of *Listeria monocytogenes* . Characteristics of the soluble hemolysin .

J. Bacteriol., 1963, 85, 349-355 .

76. GODEAU P.

Listérioses . Traité de médecine Paris, 1981, 10, 2079-2081 .

77. GOULET V.

Epidémie de listérioses à lysovar 2671-108-312 en France . B.E.H., 1993, 34, 157-158 .

78. GREGORY S.H. & WING E.J.

IFN-gamma inhibits the replication of *Listeria monocytogenes* in hepatocytes .

J. immunol., 1993, 151, (3), 1401-1409 .

79. HAGE CHAHINE C.M., DEL GIUDICE G. & LAMBERT P.H.

Hemolysin-producing *L.monocytogenes* affects the immune response to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens . Infect. Immun., 1992, 60, (4), 1415-1421 .

80. HAHN H. & KAUFMANN S.H.E.

The role of cell mediated immunity in bacterial infections .

Rev. Infect. Dis., 1981, 3, (6), 1221-1240 .

81. HALBERT S.P., SWICH L. & SONN C.

J. Exp. Med., 1955, 101, 539 .

82. HANCOCK B.M. & MC ATHEY .

Rapid detection of *Listeria* species by selective impedimetric assay .

Letters in appl. Microbiol., 1993, 16, 311-314 .

83. HARVEY P.C & FABER J.E

Some biochemical reactions of the *Listeria* group (Abstract) . J. Bacteriol., 1941, 41, 45-46 .

84. HERBERT D. & TODD E.W.

Biochem. J., 1941, 35, (2), 1124 .

85. HOF H.

Therapeutic activities of antibiotics in listeriosis . Infection, 1991, 19, (4), S 229-233 .

86. HUNTER R.

Observations on *Listeria monocytogenes* type 5 (Ivanow) isolated in New Zealand .

Med. Lab. Techn., 1973, 30, 51-56 .

87. IVANOV I.

Establishment of non-motile strain of *Listeria monocytogenes* type 5 .

Problems of listeriosis, Leicester University Press, 1975, 18-26 .

88. JACOBS J.L. & MURRAY H.W.

Why is *Listeria monocytogenes* not a pathogen in acquired immunodeficiency syndrome .

Arch. Intern. Med., 1986, 146, 1299-1300 .

89. JENKINS E.M., NJOKU-OBI A.N. & ADAMS E.W.

Purification of the soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes* .

J. Bact., 1964, 88, 418-424 .

90. JUADO L. RAFAEL. FARLEY M. MONICA & ELADIO PAREIRA .

Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection . Clin. Infect. Dis., 1993, 17 , 224-227 .

91. KALES C.P. & HOLZMAN R.S.

Listeriosis in patients with HIV infection : clinical manifestations and reponse to therapy .
J. AIDS, 1990, 3, (2), 139-143 .

92. KAUFMANN S.H.E.

Effective antibacterial protection induced by a *Listeria monocytogenes* specific T-cell clone and its lymphokine . Infect. Immun., 1983, 39, 1265-1270 .

93. KAUFMANN S.H.E.

Listeriosis : New findings .

Current concern. Microbiol. Pathogenesis, 1988, 5, 225-231 .

94. KHAN M.A., SEAMAN A. & WOODBINE M.

Listeria monocytogenes haemolysin : lecithinase .

Zentralbl. Bakteriologie . Parasitenkd . Infektionskr. Abt.1. Orig. Reihe A., 1973, 225, 66-79 .

95. KINDERLEN A., KAUFMANN S.H.E., LOHMANN-MATTHES M.

Protection of mice against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* by recombinant immune interferon . Eur. J. Immunol., 1984, 14, 964-968 .

96. KINGDON G.C. & SWORD C.P.

Biochemical and immunological effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin .

Infect. Immun., 1970, 1, 363-372 .

97. KIRSTEN NIEBUHR, TRINAD CHAKRABORTY & MANFRED ROHDE

Localization of the Act A polypeptide of *Listeria monocytogenes* in infected tissue culture cell lines : Act A is not associated with actin "comets" .

Infect. Immun., 1993, 61, (7), 2793-2802 .

98. KÖLHER S., LEIMEISTER-WACHTER M. & CHAKRABORTY T.

The gene coding for protein P60 of *L.monocytogenes* and its use as a specific probe for *L.monocytogenes* . Infect. Immun., 1990, 58, 1943-1950 .

99. KREFT J., FUNKE D. & HAAS A.

Production, purification and characterization of hemolysins from *L.ivanovii* and *L.monocytogenes* Sv 4b . F.E.M.S. Microbiology Letters, 1989, 57, 197-202 .

100. KUHN M. & GOEBEL W.

Identification of an intracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells . Infect. Immun., 1989, 57, 55-61 .

102. KUHN M. & PREVOT M.C.

A non virulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerisation of actin . Infect. Immun., 1990, 58, 3477-3486 .

103. KUSAMA H., OHASHI M. & SHIMAZAKI H.

Jap. J. Med. Sci. Biol., 1958, 11, 347-359 .

104. KVENBERG J.E.

Out breaks of listeriosis / *Listeria* contaminated foods . Microbiol. Sciences , 1988, 5, 355-358 .

105. LANE F.C. & UNANUE E.R.

Requirements of thymus (T) lymphocytes for resistance to listeriosis .

J. Exp. Med., 1972, 135, 1104-1112 .

106. MC LAUHLIN J., GILBERT J.R. & VELANI S.K.

The contamination of pate by *Listeria monocytogenes* in England and Wales in 1989-1990 .

Epidemiol. Infect., 1993, 110, 543-551 .

107. LAUGIER J., BORDERON J.C. & GOLF F.

La listériose neonatale . Rev. Prat., 1979, 29, (25), 2049-2059 .

108. LEVHNER M., KUPKE T. & GÖTZ F.

Molecular characterization and sequence of phosphatidyl-inositol-specific-phospholipase C of *Bacillus thuringiensis* . Mol. Microbiol., 1989, 3, 621-626 .

109. LE GUILLOUX M.

Listeria monocytogenes . Sa fréquence dans les produits de charcuterie .

Bull. Soc. Vet. Prat. France, 1980, 64, 45-53 .

110. LEHNERT C.

Die tenazität von *Listeria monocytogenes* in der Aussenwelt .

Zbl. Bakt. 1 Abt. Orig., 1960, 350-356 .

111. LEIMEISTER-WÄCHTER M.

Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysine in *L.monocytogenes*, *L.ivanovii* and *L.seeligeri* . Infect. Immun., 1989, 57, 2350-2357 .

112. LE MENS P.

Maîtrise des risques en fabrication fromagère . La chèvre, 1993, 195, 41-43 .

113. LE QUERREC

Listeria et listériose . Technique laitière n° 1025 .

114. LHOPITAL S.

L.monocytogenes et virulence : étude de la listériolysine O à l'aide d'anticorps monoclonaux .

Thèse, Université de Rouen 29 bis . 1991 .

115. LIU Z.Q. & CHEERS C.

The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection .

Infect. Immun., 1993, 61, (6), 2626-2631 .

116. LOVETT J., FRANCIS D.W. & HUNT J.M.

Listeria monocytogenes in raw milk : detection, incidence and pathogenicity .

J. Food Protect., 1987, 50, 188-192 .

117. MAC DONALD T.T. & CARTER P.B.

Cell mediated immunity to intestinal infection . Infect. Immun., 1980, 28, 516-523 .

118. MACKANESS G.B.

Cellular resistance to infection . J. exp. Med ., 1992, 116, 381-417 .

119. MAC KELLAR R.C.

Novel mechanism for the CAMP-reaction between *L.monocytogenes* and *C.equi* .

Int. J. Food. Microbiol., 1993, 18, (1), 77-82 .

120. MAC LAUHLIN J.

Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis . Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis., 1990, 9, 210-213 .

121. MAGEE D.M. & WING E.J.

Cloned L3T4⁺ lymphocyte protect mice against *Listeria monocytogenes* by secreting interferon gamma . J. Immunol., 1988, 141, 3203-3207 .

122. MASAO MITSUYAMA, KEN-ICHI IGARASHI & IKUO KAWAMURA .

Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes* . Infect. Immun., May1990, 1254-1260 .

123. MASCOLA L., LIEB L. & CHIU J.

Listeriosis : An uncommon opportunistic infection in patients with acquired immuno-deficiency syndrome . A report of fives cases . Ann. J. Med., 1988, 84, 162-164 .

124. MATAR G.M., BIBB W.F., HELSEL L. & SWAMINATHAN B.

Immunoaffinity, stabilisation and comparative characterisation of listeriolysin O from *L.monocytogenes* serotype 1/2a and 4b . Res. Microbiol., 1992, 143, 489-498 .

125. MAUPAS P., PHILIPPON A., AUDURIER A., BORDERON E. & BOULARD P.

Epidemiologie et pathogénies des listérioses . Sem. Hôp. Paris, 1971, 47, 43, (44), 2475-2480

126. MAZURIER S.I. & WERMARS K.

Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA . Res. Microbiol., 1992, 143, 499-505 .

127. MENARD J.L. & SERIEY F.

Listeria à la ferme . Revue laitière Francaise, 1993, 525, 27 .

128. MENARD J.L. & LE MENS P.

Lutter contre cette bactérie dans le lait . La chèvre, 1993, 195, 38-40 .

129. MENGAUD J. & CHENEVERT J.

Identification of the structural gene encoding the SH-activated hemolysin of *L.monocytogenes* : listeriolysin O is homologous to streptolysin O and pneumolysin .

Inf.Immun., 1987, 55, 3225-3227 .

130. MENGAUD J. & VINCENTE M.F.

Expression in *E.coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *L.monocytogenes* . Infect. Immun., 1988, 56, 766-772 .

131. MENGAUD J. & VINCENTE M.F.

Transcriptional mapping and nucleotide sequence of *L.monocytogenes hly A* region reveal structural features that may be involved in regulation . Infect. Immun. 1989, 57, 3695-3701 .

132. MENGAUD J. & COSSART P.

Identification of a phosphatidyl inositol specific phospholipase C activity in *L.monocytogenes* .

Mol. Microbiol., 1991, 5, 367-372 .

133. MENGAUD J. & GEOFFROY C.

Identification of a new operon involved in *L.monocytogenes* virulence : its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases . Infect. Immun., 1991, 59, 1043-1049 .

134. MENUJER A.

Epidémiologie des *Listeria* en agro-alimentaire et épreuves de virulence des souches isolées .

Thèse, UFR Pharmacie Limoges, 1992 .

135. MICHEL E. & REICH K.A.

Attenuated mutants of intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* obtained by single amino-acid substitutions in listeriolysin O . Molecul. Microbiol., 1990, 12, 2167-2178 .

136. MIELKE M.E.A., EHLERS S. & HAHN H.

T-cell subsets in delayed-type hypersensitivity, protection and granuloma formation in primary and secondary *Listeria* infection in mice : superior role of lyt-2⁺ cells in acquired immunity .
Infect. Immun., 1988, 56, 1920-1924 .

137. MIETTINEN A. & HUSU J.

Antibodies to listeriolysin O reflect the acquired resistance to *Listeria monocytogenes* in experimentally infected goats . FEMS . Microbiol. Lett., 1991, 77, 181-188 .

138. MONTAGNIER L. & ROZENBAUM W.

SIDA et infection par le VIH . Med. et Sc., Flammarion . 1989 .

139. MOUNIER J., RYTER A. & SANSONETTI J.P.

Intracellular and cell-to-cell spread of *L.monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocyte like cell line Caco-2 . Infect. Immun., 1990, 58, 1048-1058 .

140. NAKANE A. & MINAGAWA T.

Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *L.monocytogenes* infection .
Infect. Immun., 1989, 58, 2386-2388 .

141. NAKANE A., MINAGAWA T. & KATO K.

Endogenous tumour necrosis factor (cachectin) is essential to host resistance against *Listeria monocytogenes* . Infect. Immun., 1988, 56, 2563-2569 .

142. NARDAU C.J.

Listériose, détection en progrès . Moniteur des pharmacies, 1992, 2010, 24-25 .

143. NICOLAS J.A.

La listériose animale . Rev. Med. Vet., 1986, 137, (10), 645-650 .

144. NICOLAS J.A. & VIDAUD N.

Contribution à l'étude des *Listeria* presentes dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine . Rev. Med. Vet., 1987, 163, 283-285 .

145. NIEMAN R.E., LORBER B.

Listeriosis in adults : A changing pattern . Report of eight cases .
Rev. Infect. Dis., 1980, 2, 207-227 .

146. NOCERA D. & BILLE J.

Characterization by DNA restriction endonuclear analysis of *L.monocytogenes* strains related to the swiss epidemic of listeriosis . J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 2259-2263 .

147. NORTH R.J.

The mediators of anti-*Listeria* immunity as an enlarged population of short-lived replicating T-cell . Kinetics of their production . J. Exp. Med., 1973, 138, 342-355 .

148. NORTH R.J.

Nature of memory in T cell-mediated anti-bacterial immunity : anamnestic production of mediator T cells . Infect. Immun., 1975, 12, 754-760 .

149. NORTH R.J., BERCHE A.P. & NEWBORG M.F.

Immunologic consequences of antibiotic-induced by abridgment of bacterial infection : effect on generation and loss of protective T cells and level of immunologic memory .
J. Immun., 1981, 124, 342-346 .

150. OWEN R.L., RERCE N.F., APPLE R.T. & CRAY W.C.

M.cell transport of *vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches : a mecanism for antigen sampling and for microbial migration . J. Infect. Dis., 1986, 153, 1108-1118 .

151. PARK S.F. & KROLL R.G.

Expression of listeriolysin and phosphatidyl inositol-specific-phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *L.monocytogenes* .

Mol. Microbiol., 1993, 8, (4), 653-661 .

152. PAYART SALMERON C. & CARLIER C.

Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* .

Lancet, 1990, 335, 1422-1426 .

153. PICAT I.

Virulence de souches de *Listeria* d'origine alimentaire . Infection expérimentale sur la souris .

Thèse de Docteur en pharmacie, UFR Pharmacie Limoges, 1992 .

154. PINI P.N. & GILBERT R.J.

The occurrence in U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses .

Int. J.Food Microbiol., 1988, 6, 317-326 .

155. PINKNEY M., BEACHEY E. & KEHOE M.

The thiol-activated toxin streptolysin O does not require a thiol-group for cytolytic activity .

Infect. Immun., 1989, 51, 2553-2558 .

156. PORTNOY D. & JACKS P.S.

Role of hemolysin for the intracellular growth of *L.monocytogenes* .

J. Exp. Med., 1988, 167, 1459-1471 .

157. RACZ P., TENNER K. & SZIVESSY K.

Electron microscopic studies in experimental kerato-conjunctivitis listeriosis I . Penetration of *Listeria monocytogenes* into corneal epithelial cells .

Acta. Microbiol. Acad. Sci. Hung., 1970, 17, 221-236 .

158. 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,(6), 694-700 .

159. RACZ P., KAISERLING E., TENNER K. & WUTHE H.H.

Experimental *Listeria* cytitis II . Furter evidence of the epithelial phase in experimental *Listeria* infection . An electron microscopic study . Virchows. Arch. B. Zell. Phath., 1973, 13, 24-37 .

160. RAGNAUD J.M. & AUBERTIN J.

Les listérioses . Le concours medical, 1987, 1636-1640 .

161. RAPPAPORT F., ROBINOVITZ M., TOAFF R., KROCHIK N.

Genital listeriosis as a cause of repeated absortion . Lancet 1, 1960, 1273-1274 .

162. REAL F.X., GOLD J.W.M., KROWN S.E.

Listeria monocytogenes bacteremia in the acquired immuno deficiency syndrome .

Ann. Intern. Med., 1984, 101, 6, 883-884 .

163. RENAUD F. & FRENEY J.

Listeria . Lyon Pharmaceutique, 1988, 39, 175-181 .

164. RIBIERE I. & GOULET V.

La listériose : Revue générale et référence à l'épidémiologie française de 1992 .

La lettre de l'infectiologue , 1993, 8,(4) .

165. RICHARD J.

Effets de la flore de surface . Revue laitière Française, 1993, 525, 27-28 .

166. ROBERT C. BENEDICT & FRANKIE J. SCHULTZ .

An effect of iron level and food type on production of hemolysin and catalase of *L.monocytogenes* strain scott A . J. F. Protec., 1991, 54, (7), 528-531 .

167. ROBIN C. MC KELLAR

Novel mechanism for de Camp-reaction between *L.monocytogenes* and *C.equi* .
International Journal of Food Microbiology , 1993, 18, 77-82 .

168. ROCOURT J. & GRIMONT P.A.D.

Description of *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov.
Int. J. System. Bact., 1993, 866-869 .

169. ROCOURT J.

Listeria et listériose humaine ; la décennie 1979-1989 .
Ann. Inst. Pasteur Actualités, 1990, 1, (1), 25-30 .

170. ROCOURT J., GRIMONT F. & SEELIGER H.P.R.

DNA relatedness among serovars of *L.monocytogenes sensu lato* .
Curr. Microbiol., 1982, 7, 383-388 .

171. ROCOURT J. & SEELIGER H.P.R.

Distribution des espèces du genre *Listeria* . Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 1985, 259, 317-330 .

172. ROCOURT J. & JACQUET C.

Listériose humaine . Feuillet de Biologie , 1992, 33, (184), 11-20 .

173. ROHNER P., ARRIGONI E. & AUCKENTHALER R.

Activité *in vitro* des antibiotiques sur *Listeria monocytogenes* lors d'une épidémie humaine .
Med. Mal. Infect., 1992, 22, 220-225 .

174. SAUNDERS F.K. & MITCHELL T.J.

Pneumolysin the thiol-activated toxin of *streptococcus pneumoniae*, does not require a thiol group for *in vitro* activity . Infect. Immun., 1989, 57, 2547-2552 .

175. SCHUCHAT A., SWAMINATHAN B. & BROOME C.V.

Epidemiology of human listeriosis . Clin. Microbiol. Rev., 1991, 4, 169-183 .

176. SEELIGER H.P.R.

A pathogene *Listeria* : *Listeria innocua* .

Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., 1981, 249A, 487-493 .

176.a SEELIGER H.P.R. & HOHNE K.

Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species .

Methods in Microbiology. Academic press, New York, 1979, 31-49 .

177. SIIDIQUE I.H. & COOPER G.W.

Hemodynamic effect of *Listeria* hemolysin in dogs . Am. J. Physiol., 1969, 216, 1399-1403 .

178. SIDDIQUE I.H., LIN I.F. & CHUNG R.A.

Purification and characterization of hemolysin produced by *L.monocytogenes* .

Am. J.Vet. Res., 1974, 35, 289-296 .

179. SMYTH C.J. & DUNCAN J.L.

Thiol-actived (oxigen labile) cytolysins . In bacterial toxins and cell membranes .

Academic Press . Inc. New-York, 1978, 129-183 .

180. SUN A., CAMILLI A. & PORTNOY D.

Isolation of *L.monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread . Infect. Immun., 1990, 58, (11), 3770-3778 .

181. SWAMINATHAN B. & BEATTIE I.

Cloning and characterization of T-cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*.
Infect. Immun., 1990, 58, 2792-2803 .

182. SWORD C.P.

Mechanisms of pathogenesis in *L.monocytogenes* infection . J. Bacteriol., 1966, 92, 536-542 .

183. SWORD C.P. & KINGDON G.C.

Listeria monocytogenes toxin .

Microbiol. toxins. Academic Press, New York, 1971, 357-377 .

184. THAM W.A. & DANIELSSON-THAM V.M.L.

Listeria monocytogenes isolated from soft cheese . Vet. Rec., 1988, 122, 539-540 .

185. THUAULT D.

Bactéries lactiques contre *Listeria* . Revue laitière Française, 1993, 525, 28-29 .

186. TILNEY L.G. & PORTNOY D.A.

Actin filaments and the growth movement and spread of the intracellular bacterial parasite,
L.monocytogenes . J. Cell. Biol., 1989, 109, 1597-1608 .

187. TJOMB P.

"*Listeria*" : La fin de la cavale . Revue de l'industrie agro-alimentaire, 1993, 497, 45-48 .

188. VAN DISSEL J.T., STIKKELBROECKJ J.M. & VAN FURTH R.

Differences in the rate of intracellular killing of catalase negative and catalase positive *Listeria*
monocytogenes by normal and interferon gamma-activated macrophages .

Scand. J. Immunol., 1993, 37, 443-446 .

189. VASQUEZ-BOLAND J.A., DOMINGUEZ L. & FERNANDEZ J.F.

Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *L.monocytogenes* thiol activated toxin .

FEMS. Microbiol. Letters. 1989, 65, 95-100 .

190. VASQUEZ-BOLAND J.A., DOMINGUEZ L. & FERNANDEZ J.F.

Revision of the validity of CAMP-tests for *Listeria* identification . Proposal of an alternative method for the determination of hemolytic activity by *Listeria* strains .

Acta. Hung., 1990, 37, 201-206 .

191. VINCENTE M.F., BAQUERO F. & PEREZ-DIAZ J.C.

Cloning and expression of the *Listeria monocytogenes* haemolysin in *Escherichia coli* .

FEMS. Microbiol. Lett., 1985, 30, 77-79 .

192. WISON C.B. & WESTALL J.

Activation of neonatal and adult human macrophages by alpha, beta and gamma interferon .

Infect. Immun., 1985, 49, 351-356 .

193. WIRSING VON KOENING C.H., HEYMER B. & HOF H.

Course of infection and development of immunity in experimental infection of mice with *Listeria* serotypes . Infect. Immun., 1983, 40, 1170-1177 .

194. WOLF J.L., RUBIN D.H. & FINBERG R.

Intestinal M cells : a pathway for entry of reovirus into the host .Sci., 1981, 212, 471-472 .

195. WOOD S., MAROUSHEK N. & CZUPRYNSKI C.J.

Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line .

Infect. Immun., 1993, 61, (7), 3068-3072 .

196. YOSHIKAWA H., KAWAMURA I. & FUJITA M.

Membrane damage and interleukin 1 production in murine macrophages exposed to listeriolysin O . *Infect. Immun.*, 1993, 61, (4), 1334-1339 .

197. YOUNGMAN P. & BIELECKI J.

Bacillus subtilis expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells . *Nature*, 1990, 345, 175-176 .

198. ZIEGLER K. & UNANUE E.R.

Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region restricted antigen-presentation to T lymphocytes . *J. Immun.*, 1981, 127, 1869-1875 .

199. ZINKERNAGEL R.M.

Restriction by H-2 gene complex of transfer of cell-mediated immunity to *L. monocytogenes* . *Nature (Lond.)*, 1974, 251, 230-233 .

200. ZINKERNAGEL R., ALTHAGE A. & SCHREFFLER D.

H-2 restriction of cell-mediated immunity to an intracellular bacterium . Effector T cells specific for *Listeria* antigen in association with H-2I region coded self markers . *J. Exp. Med.*, 1977, 145, 1353-1367 .

Table des matières

INTRODUCTION	12
Première partie : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	13
I . LES LISTEROSES	14
I.1 Listériose animale	14
I.1.a) Formes abortives	14
I.1.b) Formes meningo-encéphaliques	15
I.1.c) Formes septicémiques	15
I.1.d) Formes asymptomatiques et mammites	15
I.2 Listériose humaine	15
I.2.a) Foeto-maternelle	16
I.2.b) Adultes et grand enfants	18
I.3 Traitement et prévention	21
I.3.a) Traitement	21
I.3.b) Prévention	27
II . RESERVOIRS	29
II.1 Milieu extérieur	29
II.2 Produits alimentaires	29
II.3 Les êtres vivants	31
III . BACTERIOLOGIE	33
III.1 Morphologie	33
III.2 Conditions de développement	34

III.3 Caractères biochimiques -----	35
III.4 Typage -----	36
III.5 Isolement -----	39
III.6 Conservation -----	43
IV . COMPORTEMENT DE LA BACTERIE -----	44
IV.1 Au sein de l'organisme -----	44
IV.2 Au niveau intra-cellulaire -----	45
V . L'HEMOLYSINE -----	48
V.1 Caractéristiques -----	48
V.2 Listériolysine et immunité -----	52
V.2.a) Généralités -----	52
V.2.b) Chez le sidéen -----	54
V.3 Recherche de l'hémolysine -----	55
V.3.a) CAMP-test traditionnel -----	55
V.3.b) Nouveau mécanisme du CAMP-test -----	56
V.4 Détermination du pouvoir hémolytique de la LLO -----	57
VI . LES AUTRES FACTEURS DE VIRULENCE -----	60
VI.1 PI-PLC -----	60
VI.2 PLC -----	61
VI.3 Métalloprotéase -----	62
VI.4 Protéine P60 -----	63
VI.5 Internaline -----	63
VI.6 Préphénate déshydratase -----	64

Deuxième partie : TRAVAUX PERSONNELS -----	65
I . MATERIEL ET METHODES -----	67
I.1 Matériel -----	67
I.1.a) Origine des souches sauvages -----	67
I.1.b) Les souris -----	68
I.1.c) Produits chimiques et milieux de culture -----	68
I.2 Méthodes -----	72
I.2.a) Préparation des inoculums -----	72
I.2.b) Dénombrement des inoculums -----	73
I.2.c) Injection des inoculums aux souris -----	73
I.2.d) Prélèvement des organes -----	74
I.2.e) Dénombrement des bactéries dans le foie et la rate -----	74
I.2.f) Extraction de l'hémolysine -----	76
I.2.g) Mesure de l'activité hémolytique -----	76
I.2.h) Etude des différents paramètres -----	81
II . RESULTATS -----	83
II.1 Identification des souches étudiées -----	83
II.1.a) Caractères d'identification classique -----	83
II.1.b) Caractères de différenciation -----	84
II.2 Dénombrement des germes dans les organes -----	86
II.3 Dosage de l'activité hémolytique -----	87
II.3.a) Recherche sur la concentration en globules rouges -----	87
II.3.b) Etude de la filtration du surnageant -----	88
II.3.c) Rôle de la solution tampon -----	88

II.3.d) Coloration finale des dilutions -----	89
II.3.e) Dosage de l'activité hémolytique en microméthode -----	90
III . DISCUSSION -----	95
CONCLUSION -----	98
BIBLIOGRAPHIE -----	100



FOULHOUX (Nathalie) - La virulence des *Listeria* : mise au point d'un protocole de dosage de la listériolysine O in vitro .

RESUME :

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

La virulence des *Listeria* est liée à l'existence de plusieurs facteurs dont l'hémolysine appelée listériolysine O .

Notre travail expérimental nous a permis de mettre au point, en microplaque, un protocole de dosage de l'hémolysine à partir de deux souches sauvages de *L.monocytogenes* serovar 4b et *L.ivanovii* serovar 5, isolées de pathologies animales et d'aliments .

En faisant varier différents paramètres expérimentaux, pH, composition du tampon, concentration en globules rouges de mouton, nous avons montré que l'activité hémolytique de *L.ivanovii* exprimée en unités hémolytiques est plus importante que celle de *L.monocytogenes* .

MOTS CLES :

- Virulence .
- *Listeria* .
- Hémolysine .



JURY : Président : Madame le professeur BOSGIRAUD.
Juges : Monsieur le professeur NICOLAS.
Madame Delebasse, Maître de conférence.
Madame GORGE, Pharmacien.